

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 786**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2008 E 08789070 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2152302**

54 Título: **Formulación de vacunas contra la meningitis**

30 Prioridad:

04.06.2007 US 933235 P

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

08.01.2016

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**CONTORNI, MARIO y
COSTANTINO, PAOLO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 555 786 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

Formulación de vacunas contra la meningitis

Campo de la técnica

5 La presente invención está en el campo de la formulación de vacunas de combinación para inmunizar contra la meningitis.

Técnica anterior

10 Las vacunas que contienen antígenos de más de un organismo patógeno dentro de una sola dosis se conocen como vacunas "multivalentes" o "de combinación", por ejemplo las vacunas contra la difteria, el tétanos y la tos ferina va("DTP") y las vacunas contra el sarampión, las paperas y la rubéola ("MMR"). Las vacunas combinadas ofrecen a los pacientes la ventaja de recibir un número reducido de inyecciones, lo que conduce a la ventaja clínica de un mayor cumplimiento (por ejemplo, véase el capítulo 29 de la referencia 1), en particular para la vacunación pediátrica. Al mismo tiempo, sin embargo, presentan dificultades debido a factores que incluyen: incompatibilidad física y bioquímica entre antígenos y otros componentes; interferencia inmunológica; y estabilidad.

15 Algunas de estas dificultades pueden abordarse mediante la formulación adecuada de la vacuna. Por ejemplo, el sacárido capsular PRP conjugado de *Haemophilus influenzae* de tipo B ("Hib") puede ser inestable en condiciones acuosas y, por tanto, las vacunas que contiene Hib en la serie INFANRIX™ (incluyendo PEDIARIX™) incluyen un componente Hib liofilizado que se reconstituye en el momento de usar por una formulación acuosa de los antígenos restantes. La referencia 2 también describe la formulación de vacunas que contienen Hib y el conjugado de Hib se liofiliza en combinación con conjugados meningocócicos, para la reconstitución extemporánea. En contraste, la referencia 3 describe formulaciones totalmente líquidas de conjugados meningocócicos, en las que otros componentes (por ejemplo, Hib o conjugados de neumococo) pueden liofilizarse y reconstituirse. La referencia 22 describe combinaciones de conjugados meningocócicos en las que los conjugados del serogrupo A ("MenA") se liofilizan para su reconstitución mediante formulaciones líquidas de conjugados de otros serogrupos.

25 Hib y el meningococo son dos causas de la meningitis bacteriana y es un objeto de la invención proporcionar más y mejores formulaciones de vacunas para conjugados de Hib y meningocócicos.

Divulgación de la invención

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, un componente líquido de Hib se utiliza para reconstituir un componente meningocócico liofilizado, produciendo de este modo una vacuna contra la meningitis combinada.

30 Por tanto, la invención proporciona un kit que comprende: (i) un componente acuoso, que comprende un conjugado de un sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo B a una concentración en el intervalo de 0,5 µg/ml a 50 µg/ml; y (ii) un componente liofilizado, que comprende conjugados de sacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, en los que la cantidad de los sacáridos meningocócicos por serogrupo está entre 1 µg y 20 µg. Para la administración a un paciente, los componentes acuosos y liofilizados se combinan, para dar una vacuna líquida combinada que es adecuada para la inyección.

35 La invención también proporciona un procedimiento para preparar una vacuna combinada, que comprende la etapa de combinar (i) un componente acuoso, que comprende un conjugado de un sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo B a una concentración en el intervalo de 0,5 µg/ml a 50 µg/ml, y (ii) un componente liofilizado, que comprende conjugados de sacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, en el que la cantidad de los sacáridos meningocócicos por serogrupo está entre 1 mg y 20 µg.

40 La invención también proporciona una vacuna que comprende: (i) un sacárido capsular conjugado de *Haemophilus influenzae* de tipo B a una concentración en el intervalo de 0,5 µg/ml a 50µg/ml; y (ii) conjugados de sacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis*, preparados mediante la combinación de un conjugado de *H. influenzae* y conjugados liofilizados de *N. meningitidis*, en el que la cantidad de los sacáridos meningocócicos por serogrupo está entre 1 mg y 20 µg. La vacuna puede incluir estabilizadores de liofilización (véase más adelante).

El componente líquido

Los kits y procedimientos de la invención implican el uso de un componente antigénico acuoso que incluye un conjugado de un sacárido de Hib. La administración del conjugado de Hib se traduce preferentemente en una concentración de anticuerpo anti-PRP en un paciente de $\geq 0,15 \mu\text{g} / \text{ml}$, y más preferiblemente $\geq 1 \mu\text{g} / \text{ml}$. Estos son los umbrales de respuesta aceptables estándar.

50 Los antígenos sacáridos de Hib son bien conocidos [por ejemplo, capítulo 14 de la referencia 1] y su preparación está bien documentada [por ejemplo, referencias 4 a 13]. El sacárido de Hib está conjugado a una proteína transportadora con el fin de potenciar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La invención puede usar cualquier conjugado Hib.

El resto sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo, poliribosilribitol fosfato de longitud completa (PRP)), pero también es posible utilizar oligosacáridos (por ejemplo, PM de ~ 1 a ~ 5 kDa). Los oligosacáridos se forman de forma conveniente mediante fragmentación del PRP purificado (*por ejemplo*, mediante hidrólisis), que normalmente irá seguida de la purificación de los fragmentos del tamaño deseado. Cuando la composición de la invención incluye un oligosacárido conjugado, la preparación de oligosacáridos debe preceder a la conjugación.

La concentración de Hib conjugado en el componente acuoso está en el intervalo de 0,5 µg/ml a 50 µg/ml *por ejemplo* de 1 µg/ml a 20 µg/ml, de 1 2µg/ml a 16 µg/ml, *etc.* La concentración puede ser de aproximadamente 15 µg/ml.

El componente acuoso de Hib puede estar sin adyuvante o puede incluir un adyuvante. Cuando se incluye un adyuvante, será típicamente una sal de aluminio por ejemplo una sal de fosfato o una sal de hidróxido. Cuando se incluye un adyuvante, el componente de Hib puede adsorberse a una sal de aluminio o puede no ser adsorbido. La adsorción a adyuvantes de fosfato de aluminio se ha comunicado que es ventajosa en algunas circunstancias [14], mientras que se ha indicado que la no adsorción es ventajosa en otras circunstancias [2].

Se conocen varios diferentes conjugados de Hib. Por ejemplo, la Tabla 14-7 de la referencia 1 muestra las características de cuatro conjugados de Hib diferentes. Estos se diferencian por varios parámetros, por ejemplo, proteína transportadora. La invención se puede usar cualquier proteína transportadora adecuada (véase más adelante), tales como CRM197 (como en 'HbOC'), el toxoide tetánico (como en 'PRP-T') y el complejo de la membrana externa de *N. meningitidis* (como en 'PRP-OMP').

Diversos conjugados de Hib acuosos están disponibles comercialmente y se pueden utilizar con la invención. Por ejemplo, el producto de Wyeth HIBTITER™ está disponible en una formulación líquida. HIBTITER™ utiliza un vehículo CRM197 y cada dosis de 0,5 ml (suministrada en viales) contiene 10 µg de sacárido en cloruro de sodio al 0,9 %, sin adyuvante. El producto PEDVAXHIB™ de Merck también está disponible en una formulación líquida. PEDVAXHIB™ utiliza un vehículo OMPC y cada dosis de 0,5 ml contiene 7,5 mg de sacárido con 225 µg de adyuvante de sulfato hidroxifosfato de aluminio en cloruro de sodio al 0,9 %. Está libre de tanto lactosa y timerosal. El producto ActHIB™ no se encuentra disponible actualmente en forma líquida. Otro conjugado de Hib útil comprende un oligosacárido Hib unido covalentemente a CRM₁₉₇ a través de un ligador de ácido adípico [15,16].

El conjugado de Hib puede ser el único ingrediente antigénico en el componente acuoso, o puede haber uno o más antígenos adicionales. Por ejemplo, el componente acuoso puede incluir uno o más de: un toxoide de la difteria, un toxoide del tétanos, el antígeno(s) de tos ferina acelular, los antígenos inactivados del virus de la polio, el antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B, y / o el sacárido neumocócico. Cuando el componente acuoso está adyuvado e incluye un conjugado de Hib, un toxoide de la difteria, un toxoide del tétanos, los antígenos de tos ferina acelular, los antígenos inactivados del virus de la polio y el antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B, se puede usar el producto HEXAVAC™. Cuando el componente acuoso está adyuvado e incluye un conjugado de Hib, un toxoide de la difteria, un toxoide del tétanos, los antígenos de tos ferina de células enteras, el antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B, se puede usar el producto QUINVAXEM™. Cuando el componente acuoso está adyuvado e incluye un conjugado de Hib, un toxoide de la difteria, un toxoide del tétanos, los antígenos de tos ferina acelular, los antígenos inactivados del virus de la polio, se puede usar el producto PEDIACEL™.

Las conjugados de Hib monovalentes líquidos comercialmente disponibles son componentes acuosos preferidos para uso con la invención, tales como la vacuna sin adyuvante HIBTITER™. En la ref. 2 se mencionan ventajas aparentes de evitar un adyuvante cuando se combinan conjugados de Hib y meningocócicos.

El componente liofilizado

Los kits y procedimientos de la invención implican el uso de un componente antigénico liofilizado que incluye conjugados de sacáridos capsulares de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y. La administración del conjugado meningocócico da como resultado preferiblemente una respuesta de anticuerpos bactericida, con un aumento del título en el ensayo bactericida en suero (SBA) para el serogrupo relevante de al menos 4 veces y, preferiblemente, de al menos 8 veces, medido con complemento humano [17]. Si se usa complemento de conejo para medir los títulos de SBA, el aumento del título es, preferiblemente, de al menos 128 veces.

Las vacunas monovalentes conjugadas contra el serogrupo C se han aprobado para uso humano e incluyen MENJUGATE™, MENINGITEC™ y NEISVAC-C™. Se conocen mezclas de conjugados de los serogrupos A+C [19,20] y se han notificado mezclas de conjugados de los serogrupos A+C+W135+Y [21-24] y se aprobaron en 2005 como el producto acuoso MENACTRA™. El componente liofilizado usado con la invención incluye los conjugados meningocócicos A + C + W135 + Y.

Los conjugados pueden estar presentes en masas sustancialmente iguales, por ejemplo, la masa de sacárido de cada serogrupo está dentro de ± 10 % de la otra. Una cantidad típica por serogrupo en el componente liofilizado está entre 1 µg y 20 µg, por ejemplo entre 2 y 10 µg por serogrupo, o aproximadamente 4 µg. Como alternativa a una proporción sustancialmente igual, se puede usar una doble masa de sacárido del serogrupo A.

5 El sacárido capsular del meningococo del serogrupo A es un homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato unido a ($\alpha 1 \rightarrow 6$), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. La acetilación en la posición C-3 puede ser del 70-95 %. Las condiciones usadas para purificar el sacárido pueden dar lugar a la O-acetilación (por ejemplo, en condiciones básicas), pero es útil conservar el OAc en esta posición C3. En algunas realizaciones, al menos el 50 % (por ejemplo, al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) de los residuos de manosa en sacáridos del serogrupo A también está O-acetilado en la posición C-3. Los grupos acetilo pueden sustituirse con grupos bloqueantes para prevenir la hidrólisis [25], y estos sacáridos modificados siguen siendo sacáridos del serogrupo A dentro del significado de la invención.

10 EL sacárido capsular del serogrupo C es un homopolímero de ácido siálico unido a ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (ácido N-acetilneuramínico o 'NeuNAc'). La estructura del sacárido se escribe como $\rightarrow 9$ -Neu p NAc 7/8 OAc-($\alpha 2 \rightarrow$). La mayoría de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en C-7 y/o C-8 de los residuos de ácido siálico, pero aproximadamente el 15 % de los aislamientos clínicos carecen de estos grupos O-acetilo [26,27]. La presencia o ausencia de grupos OAc genera epitopos únicos y la especificidad de la unión del anticuerpo al sacárido puede afectar a su actividad bactericida contra las cepas O-acetiladas (OAc+) y des-O-acetiladas (O-Ac) [28-30]. Los sacáridos del serogrupo C usados con la invención se pueden preparar a partir de cepas OAc+ u OAc-. Las vacunas conjugadas MenC aprobadas incluyen sacáridos tanto OAc-(NEISVAC-C™) como OAc+ (MENJUGATE™ & MENINGITEC™). En algunas realizaciones, las cepas para la producción de los conjugados del serogrupo C son cepas OAc+, por ejemplo del serotipo 16, serosubtipo P1.7a,1, etc. Por tanto, se pueden usar cepas C:16:P1.7a,1 OAc+. Las cepas OAc+ del serosubtipo P1.1 también son útiles, tal como la cepa C11.

20 El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades del disacárido ácido siálico-galactosa. Como el sacárido del serogrupo C, tiene O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [31]. La estructura se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/90Ac)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Gal- α -(1 \rightarrow).

25 El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, a excepción de que la unidad de disacárido de repetición incluye glucosa en lugar de galactosa. Como el serogrupo W135, tiene O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [31]. La estructura del serogrupo Y se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/90Ac)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Glc- α -(1 \rightarrow).

30 Los sacáridos usados de acuerdo con la invención pueden estar O-acetilados, como se ha descrito antes (por ejemplo, con el mismo patrón de O-acetilación que se ve en los sacáridos capsulares nativos) o pueden estar parcial o totalmente O-acetilados en una o más posiciones de los anillos de sacárido, o pueden estar hiper-O-acetilados respecto a los sacáridos capsulares nativos,

35 Los restos sacáridos en los conjugados pueden comprender sacáridos de longitud completa o los preparados a partir de meningococos o pueden comprender fragmentos de sacáridos de longitud completa, es decir, los sacáridos pueden ser más cortos que los sacáridos capsulares nativos que se ven en las bacterias. Por tanto, los sacáridos pueden estar despolimerizados, produciéndose la despolimerización durante o después de la purificación del sacárido pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de la cadena de los sacáridos. Un procedimiento de despolimerización implica el uso de peróxido de hidrógeno [21]. El peróxido de hidrógeno se añade a un sacárido (por ejemplo, para dar una concentración final de H₂O₂ del 1 %) y la mezcla se incuba después (por ejemplo, a aproximadamente 55 °C) hasta que se ha conseguido una reducción deseada de la longitud de la cadena. Otro procedimiento de despolimerización implica hidrólisis ácida [22]. Otros procedimientos de despolimerización se conocen en la técnica. Los sacáridos usados para preparar los conjugados para usar de acuerdo con la invención se pueden obtener mediante cualquiera de estos procedimientos de despolimerización. La despolimerización se puede usar para proporcionar una longitud de cadena óptima para inmunogenicidad y/o para reducir la longitud de cadena para que los sacáridos se puedan manipular físicamente. En algunas realizaciones, los sacáridos tienen el siguiente intervalo de grados medios de despolimerización (Dp): A=10-20; C=12-22; W135=15-25; Y=15-25. En términos de peso molecular, en lugar del Dp, los intervalos preferidos son, para todos los serogrupos: <100 kDa; 5 kDa-7 5kDa; 7 kDa-50 kDa; 8 kDa-35 kDa; 12 kDa-25 kDa; 15 kDa-22 kDa.

45 En algunas realizaciones, el peso molecular medio para los sacáridos de cada serogrupo meningocócico A, C, W135 e Y puede ser más de 50 kDa, por ejemplo ≥ 75 kDa, ≥ 100 kDa, ≥ 110 kDa, ≥ 120 kDa, ≥ 130 kDa, etc. [32], e incluso de hasta 1500 kDa, en concreto tal como se determina mediante MALLS. Por ejemplo: un sacárido de MenA puede estar en el intervalo 50-500 kDa *por ejemplo* 60-80 kDa; un sacárido de MenC puede estar en el intervalo de 100-210 kDa; un sacárido de MenW135 puede estar en el intervalo de 60-190 kDa por ejemplo 120-140kDa; y / o un sacárido de MenY puede estar en el intervalo de 60-190 kDa por ejemplo 150-160kDa

55 Proteínas vehículo útiles (véase más adelante) incluyen CRM197, el toxoide de la difteria y / o el toxoide del tétanos. Cuando el componente liofilizado incluye conjugados de más de un serogrupo meningocócico, los diversos conjugados pueden usar diferentes proteínas vehículo (por ejemplo, un serogrupo en CRM197, otro en el toxoide del tétanos) o pueden usar la misma proteína transportadora (por ejemplo, sacáridos de dos serogrupos conjugados por separado a CRM197 y, después, combinados).

Por razones de estabilidad, un componente liofilizado puede incluir un estabilizador tal como lactosa, sacarosa y manitol, así como mezclas de los mismos por ejemplo mezclas de lactosa / sacarosa, mezclas de sacarosa / manitol,

etcétera. La vacuna final puede, por lo tanto, contener lactosa y / o sacarosa Utilizando una mezcla de sacarosa / manitol se puede acelerar el proceso de secado. Un componente liofilizado puede también incluir cloruro sódico. Los componentes solubles en el material liofilizado se conservarán en la composición después de la reconstitución.

El componente liofilizado puede o no puede incluir un adyuvante, tal como una sal de aluminio.

- 5 El componente liofilizado preferiblemente no incluye un sacárido Hib.

Invasado de las composiciones de la invención

Los componentes húmedos y secos utilizados con la invención deben mantenerse separados unos de otros antes de su uso. Por lo tanto se envasan por separado en la forma de un kit. El kit puede tomar varias formas.

- 10 En algunas realizaciones, los dos componentes se envasan en recipientes separados. En otras formas de realización, los dos componentes se envasan en cámaras separadas de un único recipiente, por ejemplo en recipientes separados de una jeringuilla de cámaras múltiples. Una jeringuilla de doble cámara permite que dos composiciones individuales se mantengan separadas durante el almacenamiento, sino que se mezclen cuando se activa el émbolo de la jeringuilla.

- 15 El material liofilizado por lo general se presentará en un vial sellado. El vial tendrá una abertura (*por ejemplo*, un sello de goma, un cuello rompible, *etcétera*) que puede mantener la esterilidad al tiempo que permite la eliminación de su contenido y / o la introducción de material acuoso para la reconstitución. Los viales pueden estar hechos de varios materiales por ejemplo de un vidrio, de un plástico, etcétera.

- 20 El material acuoso también puede presentarse en un vial, pero como alternativa puede presentarse en, por ejemplo, una jeringuilla. De nuevo, el recipiente será capaz de mantener la esterilidad al tiempo que permite la eliminación de su contenido. Una jeringuilla se puede aplicar con o sin una aguja unida a ella; en este último caso, puede envasarse una aguja separada con la jeringuilla para su montaje y uso, y la jeringuilla tendrá generalmente un capuchón en la punta para sellar la punta antes de la fijación de una aguja. Se prefieren las agujas de seguridad. Son típicas las agujas de 2,54 cm cal 23, 2,54 cm cal 25 y 1,6 cm cal 25. El émbolo en la jeringuilla puede tener un tope para evitar que el émbolo sea retirado accidentalmente durante la aspiración. Las jeringuillas pueden estar hechas de varios materiales por ejemplo de un vidrio, de un plástico, etcétera.

- 25 Un vial puede tener una tapa (por ejemplo, un cierre de tipo Luer) adaptada de modo que se pueda insertar en la tapa una jeringuilla precargada, expeler los contenidos de la jeringuilla hacia el interior del vial (por ejemplo, para reconstituir el material liofilizado en su interior) y de modo que los contenidos del vial se puedan volver a introducir en la jeringuilla. Tras la retirada de la jeringuilla del vial, se puede insertar una aguja y la composición se puede administrar a un paciente. La tapa está dentro de un sello o cubierta, de modo que el sello o cubierta ha de retirarse antes de poder acceder a la tapa.

- 30 Cuando el material se envasa en un recipiente, el recipiente generalmente se esterilizará antes de añadir el material al mismo.

- 35 Cuando se usa un recipiente de vidrio (por ejemplo, una jeringuilla o un vial), de forma útil puede estar hecho de vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de cal sodada.

Reconstitución

Antes de la administración a un paciente, la invención implica la reconstitución de un componente antigénico liofilizado (que contiene los conjugados meningocócicos) con un componente acuoso (que contiene el conjugado Hib). La reconstitución puede implicar varias etapas.

- 40 Si los componentes están presentes en una jeringuilla de varias cámaras, el accionamiento de la jeringuilla combinarán los materiales acuosos y secos. Cuando los componentes están presentes en recipientes separados, se pueden utilizar diferentes procesos de mezcla. En algunas realizaciones, el material acuoso en un vial puede extraerse a una jeringuilla (*por ejemplo*, a través de una aguja), o puede ya estar presente en una jeringuilla. Después, el material acuoso puede transferirse desde la jeringuilla a un vial que contiene el material liofilizado (*por ejemplo*, a través de una aguja, que puede ser la misma o diferente de una aguja previamente utilizada para extraer el material acuoso de un vial). De este modo, el material liofilizado se reconstituye y puede extraerse (por ejemplo, a través de una aguja, siendo de nuevo la misma o diferente de una aguja usada previamente) en una jeringuilla (*por ejemplo*, la misma o diferente de una jeringuilla usada previamente), a partir de la cual se puede inyectar en un paciente (*por ejemplo*, a través de una aguja, siendo de nuevo la misma o diferente de una aguja usada previamente).

- 50 Una vez que el material liofilizado y el material acuoso se han combinado y están presentes en un dispositivo de administración (normalmente una jeringuilla), la composición se puede administrar a un paciente. La reconstitución típicamente tendrá lugar inmediatamente antes de la administración a un paciente, *por ejemplo* no más de 30 minutos antes de la inyección.

Después de la reconstitución, una composición para administración a un paciente incluirá conjugados de Hib y meningocócicos. Un conjugado Hib se origina a partir de material acuoso original y un conjugado meningocócico se origina a partir de material liofilizado original.

5 La masa de sacárido Hib en la vacuna reconstituida de la invención está en el intervalo de 0,5 µg a 50 µg por ejemplo, de 1 - 20µg, de 10 – 15 µg, de 12 – 16 µg, etc. La cantidad puede ser de aproximadamente 12,5 µg. Una masa de menos de 5 µg puede ser adecuada [33] *por ejemplo* en el intervalo de 1-5 µg, 2-4 µg, o de aproximadamente 2,5 µg.

10 La masa del sacárido meningocócico por serogrupo en la vacuna reconstituida está entre 1 µg y 20 µg, *por ejemplo* entre 2 y 10 µg por serogrupo, o de aproximadamente 5 µg o de aproximadamente 10 µg. Los conjugados pueden ser presentes en masas sustancialmente iguales por ejemplo, la masa del sacárido de cada serogrupo está dentro de + 10 % uno de otro. Como alternativa a una proporción igual, se puede usar una masa doble del sacárido del serogrupo A. Por tanto, una vacuna puede incluir el sacárido MenA a 10 µg y los sacáridos MenC, W135 e Y a 5 µg cada uno.

15 En algunas realizaciones, la masa de sacárido DE Hib será sustancialmente la misma que la masa de un sacárido del serogrupo meningocócico particular. En algunas realizaciones, la masa del sacárido Hib será mayor que (por ejemplo, al menos 1,5 x) la masa de un sacárido de serogrupo meningocócico particular. En algunas realizaciones, la masa del sacárido Hib será menor que (por ejemplo, al menos 1,5 x) la masa de un sacárido de serogrupo meningocócico particular.

20 Cuando una composición incluye sacáridos de más de un serogrupo meningocócico, existe una masa media de sacárido por serogrupo. Si se usan masas sustancialmente iguales de cada serogrupo, la masa media será la misma masa que cada una individual; cuando se usan masas no iguales, la media será diferente, por ejemplo con una cantidad de 10:5:5:5 µg para una mezcla Men-ACWY, la masa media es de 6,25 µg por serogrupo. En algunas realizaciones, la masa de sacárido DE Hib será sustancialmente la misma que la masa media de un sacárido del serogrupo meningocócico por serogrupo. En algunas realizaciones, la masa del sacárido Hib será mayor que (por ejemplo, al menos 1,5 x) la masa media del sacárido meningocócico por serogrupo. En algunas realizaciones, la masa del sacárido Hib será menor que (por ejemplo, al menos 1,5 x) la masa media del sacárido meningocócico por serogrupo [34].

Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna

30 La invención implica la coadministración de conjugados de Hib y meningocócicos en la forma de una vacuna de combinación. Las composiciones reconstituidas son adecuadas para la administración a pacientes humanos y la invención proporciona un procedimiento para elevar una respuesta inmunitaria en un paciente, que comprende la etapa de administrar una composición de la invención al paciente.

La invención también proporciona una composición de la invención para usar en medicina.

35 La invención también proporciona el uso de (i) un componente acuoso, que comprende un conjugado de un sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo B a una concentración en el intervalo de 0,5 µg/ml a 50 µg/ml, y (ii) un componente liofilizado, que comprende conjugados de sacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, en el que la cantidad de los sacáridos meningocócicos por serogrupo está entre 1 µg y 20 µg, en la fabricación de un medicamento para la administración a un paciente.

40 La invención también proporciona una combinación de de (i) un componente acuoso, que comprende un conjugado de un sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo B a una concentración en el intervalo de 0,5 µg/ml a 50 µg/ml, y (ii) un componente liofilizado, que comprende conjugados de sacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, en el que la cantidad de los sacáridos meningocócicos por serogrupo está entre 1 µg y 20 µg, para usar en inmunización.

45 Las composiciones reconstituidas de la invención son, preferiblemente, vacunas, para su uso en la reducción o prevención de la meningitis bacteriana, incluyendo la meningitis meningocócica y la meningitis por Hib.

Los pacientes para recibir las composiciones de la invención pueden ser de menos de 2 años de edad *por ejemplo* con edades comprendidas entre 0-12 meses. Un grupo particular de pacientes tiene entre 1 y 3 mese de edad, y no ha recibido previamente una vacuna conjugada contra el meningococo.

50 Con el fin de tener una eficacia completa, un programa de inmunización primaria típica para un niño puede implicar la administración de más de una dosis. Por ejemplo , las dosis pueden estar en: 0, 2 y 4 meses (siendo al tiempo 0 la primera dosis); 0, 1 y 2 meses; 0 y 2 meses; 0, 2 y 8 meses; *etcétera*. La primera dosis (tiempo 0) puede administrarse a aproximadamente los 2 meses de edad, o, algunas veces (*por ejemplo* en un calendario de 0-2-8 meses) aproximadamente a los 3 meses de edad.

55 Las composiciones también se pueden utilizar como dosis de refuerzo *por ejemplo* para los niños, en el segundo año de vida.

Las composiciones de la invención se pueden administrar mediante inyección intramuscular en, por ejemplo, el brazo, la pierna o las nalgas.

Cuando las composiciones de la invención incluyen un adyuvante a base de aluminio, se puede producir sedimentación de los componentes durante el almacenamiento. Por lo tanto, las composiciones acuosas deben agitarse antes y después de la reconstitución, antes de la administración a un paciente.

Conjugación

La invención utiliza conjugados de Hib y meningocócicos en lo que los sacáridos capsulares se conjugan con proteínas vehículo. Proteínas vehículo útiles para la conjugación covalente son las toxinas bacterianas o toxoides, tales como el toxoide de la difteria o el toxoide del tétanos, o derivados de los mismos tales como el mutante de la toxina diftérica CRM197 [35-37]. Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [38], péptidos sintéticos [39,40], proteínas del shock térmico [41,42], proteínas de pertussis [43,44], citocinas [45], linfocinas [45], hormonas [45], factores de crecimiento [45], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de células T CD4+ humanas de varios antígenos derivados de patógenos [46], tales como N19 [47], proteína D de *H. influenzae* [48, -50], neumolisina [51], proteína de superficie neumocócica PspA [52], proteínas de captación de hierro [53], toxina A o B de *C. difficile* [54], etc.

El toxoide diftérico (Dt), el toxoide del tétanos (Tt) y CRM197 son los principales vehículos actualmente en uso en las vacunas pediátricas, *por ejemplo* los conjugados de Hib de GSK utilizan Tt como vehículo, el producto HIBTITER™ utiliza CRM 197, los conjugados de neumococo en PREVENAR™ usan CRM197, los productos MENJUGATE™ y MENINGITEC™ utilizan CRM 197 y NEIS-VAC-C™ utiliza Tt.

Se pueden usar los conjugados con una proporción sacárido:proteína (p/p) de ente 1:5 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido), por ejemplo proporciones entre 1:2 y 5:1 y proporciones entre 1:2.5 y 1:2.5. Como se describe en la referencia 55, conjugados de diferentes serogrupos en una mezcla pueden tener diferentes proporciones sacárido:proteína, por ejemplo una puede tener una proporción entre 1:2 y 1:5, mientras que otra tiene una proporción entre 5:1 y 1:1.99.

Los conjugados se pueden usar junto con la proteína transportadora libre [56]. Cuando una proteína transportadora dada está presente en forma tanto libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada puede ser no superior al 5 % de la cantidad total de la proteína transportadora en la composición como un todo y, más normalmente, presente a menos del 2 % en peso.

Se puede usar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier ligador adecuado cuando sea necesario.

Normalmente, el sacárido se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (por ejemplo, 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [57, 58 etc.]). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 11).

Se pueden establecer enlaces a través de un grupo ligador usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 59 y 60. Un tipo de enlace implica la aminación reductora del polisacárido, acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo ligador de ácido adípico y, después, acoplamiento de una proteína en el otro extremo del grupo ligador de ácido adípico [61,62]. Otros ligadores incluyen β-propionamido [63], nitrofenil-etilamina [64], haluros de haloacilo [65], enlaces glicosídicos [66], ácido 6-aminocaproico [67], ADH [68], restos de C₄ a C₁₂ [69] etc. También se puede usar condensación con carbodiimida [70]. Como una alternativa al uso de un enlazador, se puede usar un enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender oxidación del polisacárido, seguida de aminación reductora con la proteína, tal como se ha descrito en, por ejemplo, las referencias 71 y 72.

Un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, mediante sustitución de los grupos =O terminales con -NH₂), seguido por derivación con un diéster adípico (por ejemplo, N-hidroxisuccinimido diéster de ácido adípico) y se puede usar la reacción con la proteína transportadora. En otra reacción útil, un sacárido se derivatiza con un reactivo de cianilación, seguido de acoplamiento a una proteína (directa o después de la introducción de un grupo tiol o nucleófilo hidrazida en el vehículo), sin la necesidad de usar un enlazador. Los reactivos de cianilación adecuados incluyen tetrafluoroborato de 1-ciano-4- (dimetilamino) piridinio ('CDAP'), p-nitrofenilcianato y tetrafluoroborato de N-cianotrietilamonio ('CTEA').

Como se describe en la referencia 73, una mezcla puede incluir un conjugado con enlace sacárido/proteína directo y otro conjugado con enlace a través de un ligador. Esta disposición se aplica en concreto cuando se usan conjugados sacáridos de diferentes serogrupos meningocócicos, por ejemplo los sacáridos MenA y MenC se pueden conjugar a través de un ligador, mientras que los sacáridos MenW135 y MenY se pueden conjugar directamente a una proteína transportadora.

Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados se pueden separar. Hay muchos procedimientos adecuados para esta separación, incluidos cromatografía hidrofóbica, ultrafiltración tangencial, diafiltración etc.

(véanse también las referencias 74 y 75, etc.). Si una vacuna comprende un sacárido dado tanto en forma libre como conjugada, la forma no conjugada es, de forma útil, no más que el 20 % en peso de la cantidad total de tal sacárido en la composición como un todo (por ejemplo, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2\%$, $\leq 1\%$).

- 5 La cantidad de vehículo (conjugado y no conjugado) de cada conjugado puede ser no superior a 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, por ejemplo $< 30 \mu\text{g} / \text{ml}$ de la proteína transportadora de cada conjugado. Algunas composiciones incluyen una concentración total del vehículo de menos de 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ por ejemplo, $< 400 \mu\text{g} / \text{ml}$, $< 300 \mu\text{g} / \text{ml}$, $< 200 \mu\text{g} / \text{ml}$, $< 100 \mu\text{g} / \text{ml}$, $< 50 \mu\text{g} / \text{ml}$, etc.

Características de las composiciones de la invención

- 10 Además de los componentes antigénicos descritos anteriormente, las composiciones de la invención (tanto antes como después de la mezcla) generalmente incluirán un componente no antigénico. El componente no antigénico puede incluir vehículos, adyuvantes, excipientes, tampones, etc., como se describe en más detalle a continuación.

Las composiciones de la invención normalmente incluirán uno o más vehículos farmacéuticos y/o excipientes. Un transportador típico es la solución salina fisiológica tamponada con fosfato estéril y sin pirógenos. En la referencia 76 se puede encontrar una exhaustiva discusión de excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 15 Para controlar la tonicidad, es útil incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. El cloruro sódico (NaCl) es una de estas sales, que puede estar presente a entre 1 y 20 mg/ml.

Las composiciones acuosas (antes y / o después de la reconstitución del material liofilizado) tendrán generalmente una osmolalidad de entre 200 mOsm / kg y 400 mOsm / kg, por ejemplo entre 240 - 360 mOsm / kg, o dentro del intervalo de 290 - 320 mOsm / kg

- 20 Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más tampones. Entre los tampones típicos se incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina; o un tampón citrato. Normalmente, los tampones estarán incluidos en el intervalo de 5-20 mM. Tales tampones pueden incluirse en los componentes acuosos y / o liofilizados.

- 25 Generalmente, el pH de una composición acuosa estará entre 5,0 y 7,5, y más normalmente entre 5,0 y 6,0, para una estabilidad óptima o entre 6,0 y 7,0.

Preferentemente, las composiciones de la invención son estériles.

Preferentemente, las composiciones de la invención son apirógenas, por ejemplo que contienen < 1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y, preferentemente, $< 0,1$ UE por dosis.

Las composiciones de la invención no tienen gluten.

- 30 Algunas vacunas de la invención no están adyuvadas. Otras vacunas de la invención incluyen adyuvante. Las vacunas sin adyuvante se pueden preparar mediante la combinación de componentes no adyuvados. Las vacunas con adyuvante se pueden realizar mediante la combinación de varios componentes adyuvados y mediante la combinación de componentes adyuvados y no adyuvados o mediante la combinación de componentes sin adyuvante con un adyuvante.

- 35 Cuando los antígenos se adsorben, una composición puede ser una suspensión con un aspecto turbio. Este aspecto significa que la contaminación microbiana no se puede ver fácilmente y, por tanto, la vacuna contiene, preferentemente, un agente antimicrobiano. Esto es particularmente importante cuando la vacuna está envasada en recipientes de múltiples dosis. Los conservantes útiles para incluir son 2-fenoxietanol y/o timerosal. Se recomienda, sin embargo, no utilizar conservantes de mercurio (por ejemplo, timerosal) cuando sea posible. Se prefiere que las composiciones de la invención contengan menos de aproximadamente 25 ng / ml de mercurio. Tales conservantes pueden incluirse en los componentes acuosos y / o liofilizados.

La concentración de cualquier sal de aluminio en una composición, expresado en términos de Al^{3+} es, preferentemente, inferior a 5 mg/ml, por ejemplo $\leq 4 \text{ mg/ml}$, $\leq 3 \text{ mg/ml}$, $2 \leq \text{mg/ml}$, $\leq 1 \text{ mg/ml}$, $< 0,85 \text{ mg/ml}$, etc.

- 45 Las composiciones de la invención pueden administrarse a los pacientes en dosis de 0,5 ml. Se entenderá que las referencias a las dosis de 0,5 ml incluyen las variaciones normales, por ejemplo $0,5 \text{ ml} \pm 0,05 \text{ ml}$.

Adyuvantes

- 50 Las composiciones de la invención pueden incluir un adyuvante, y este adyuvante puede comprender una o más sales de aluminio, y en particular un adyuvante de fosfato de aluminio y / o un adyuvante de hidróxido de aluminio. Los componentes antigénicos utilizados para preparar las composiciones de la invención pueden incluir adyuvantes de aluminio antes de usar, se "premezclan" o "preadsorben" en el adyuvante (s). Los adyuvantes de aluminio actualmente en uso normalmente se denominan adyuvantes de "hidróxido de aluminio" o "fosfato de aluminio". No obstante, estos son nombres de consenso, ya que ninguna es una descripción precisa del compuesto químico real

que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 77). La invención puede utilizar cualquiera de las sales "hidróxido" o "fosfato" que son de uso general como adyuvantes.

5 Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son, normalmente, sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son, al menos parcialmente, cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que se puede representar con la fórmula $\text{AlO}(\text{OH})$, se puede distinguir de otros compuestos de aluminio, tal como hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$, mediante espectroscopia de infrarrojos (IR), en particular mediante la presencia de una banda de adsorción a 1070 cm^{-1} y un fuerte hombro a $3090\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$ (capítulo 9 de ref. 77).

10 Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son, normalmente, sales de hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo también una pequeña cantidad de sulfato. Pueden obtenerse mediante precipitación y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación pueden influir sobre el grado de sustitución del fosfato por hidroxilo en la sal. En general, los hidroxifosfatos tienen una proporción molar de PO_4/Al entre 0,3 y 0,99. Los hidroxifosfatos se pueden distinguir de AlPO_4 mediante la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda del espectro IR a 3164 cm^{-1} (por ejemplo, cuando se sella a $200 \text{ }^\circ\text{C}$) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de la ref. 77).

15 La proporción molar $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ de un adyuvante de fosfato de aluminio estará, en general, entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y, más preferentemente, $0,95 \pm 0,1$. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluido a $0,6 \text{ mg}$ de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio será, en general, particulado. Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de $0,5\text{-}20 \text{ }\mu\text{m}$ (por ejemplo, de aproximadamente $5\text{-}10 \text{ }\mu\text{m}$) después de la adsorción de cualquier antígeno.

20 El PZC de fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar en función de las condiciones de reacción y la concentración de los reactantes usado para la preparación de la sal mediante precipitación. PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato= PCZ más ácido) o añadiendo un tampón tal como un tampón de histidina (hace que el PZC sea más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención
25 tendrán, en general, un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5, por ejemplo de aproximadamente 5,7.

Una solución de fosfato de aluminio usada para preparar una composición de la invención puede contener un tampón (por ejemplo, un fosfato o una histidina o un tampón Tris), pero esto no siempre es necesario. La solución de fosfato de aluminio es, preferentemente, estéril y apirógena. La solución de fosfato de aluminio puede incluir iones
30 fosfato acuosos libres, por ejemplo presentes a una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferentemente entre 5 y 15 mM, y más preferentemente de aproximadamente 10 mM. La solución de fosfato de aluminio puede también comprender cloruro sódico. La concentración de cloruro sódico está, preferentemente, en el intervalo de 0,1 a 100 mg/ml (por ejemplo, $0,5\text{-}50 \text{ mg/ml}$, $1\text{-}20 \text{ mg/ml}$, $2\text{-}10 \text{ mg/ml}$) y, más preferentemente, es de aproximadamente $3 \pm 1 \text{ mg/ml}$. La presencia de NaCl facilita la medición correcta del pH antes de la adsorción de antígenos.

35 Otros antígenos que se pueden incluir

Además de incluir conjugado de sacáridos de *N. meningitidis* y Hib, las composiciones pueden incluir además uno o más antígenos. Por ejemplo, pueden incluir antígenos de otros patógenos, especialmente de bacterias y / o virus. Los antígenos adicionales adecuados pueden seleccionarse a partir de:

- un toxoide diftérico ("D")
- 40 • un toxoide del tétanos ("T")
- un antígeno de la tos ferina ("P"), que suele ser acelular ("aP")
- un antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B (HBV) ('HBsAg')
- vacuna antipoliomielítica inactivada (IPV)
- un antígeno de virus de hepatitis A (HAV)
- 45 • un sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*

Estos antígenos normalmente se originan en el componente acuoso de la invención.

Toxoide diftérico

50 *Corynebacterium diphtheria* causa la difteria. La toxina de la difteria se puede tratar (por ejemplo, usando formalina o formaldehído) para eliminar la toxicidad mientras que conserva la capacidad de inducir anticuerpos específicos anti-toxina después de la inyección. Estos toxoides diftéricos se utilizan en vacunas contra la difteria, y se divulgan con más detalle en el capítulo 13 de la referencia 1. Los toxoides diftéricos preferidos son los preparados por tratamiento con formaldehído. El toxoide de la difteria se puede obtener mediante el cultivo de *C. diphtheriae* en medio de

crecimiento (por ejemplo, medio Fenton, o medio Linggoud y Fenton), que puede suplementarse con extracto de bovino, seguido de tratamiento formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material toxoide puede tratarse después mediante un proceso que comprende la filtración y / o diálisis estéril.

5 Las cantidades del toxoide de la difteria pueden expresarse en unidades internacionales (UI). Por ejemplo, el NIBSC suministra el 'Diphtheria Toxoid Adsorbed Third International Standard 1999' [78,79], que contiene 160 UI por ampolla. Como una alternativa al sistema de UI, la unidad 'Lf' ("unidades de floculación" o la "dosis de floculación") se define como la cantidad de toxoide que, cuando se mezcla con una Unidad Internacional de antitoxina, produce una mezcla óptima de floculación [80]. Por ejemplo , el NIBSC suministra 'toxoide diftérico, sencillo'[81] , que contiene 300 LF por ampolla, y también suministra' "el primer reactivo de referencia internacional para el toxoide diftérico para el ensayo de floculación" [82] , que contiene 900 LF por ampolla.

10 Las composiciones incluyen típicamente entre 20 y 80 Lf de toxoide de la difteria, típicamente aproximadamente 50 Lf.

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

El toxoide de la difteria se adsorbe útilmente sobre un adyuvante de hidróxido de aluminio.

15 Toxoide del tétanos

Clostridium tetani causa el tétanos. La toxina del tétano puede tratarse para dar un toxoide protector. Los toxoides se utilizan en vacunas contra el tétanos, y se divulgan con más detalle en el capítulo 27 de la referencia 1. Los toxoides del tétanos preferidos son los preparados por tratamiento con formaldehído. El toxoide del tétanos se puede obtener cultivando *C. tetani* en medio de crecimiento (por ejemplo, un medio Latham derivado de caseína bovina), seguido de tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material puede tratarse después mediante un proceso que comprende la filtración y / o diálisis estéril.

20 Las cantidades del toxoide del tétanos pueden expresarse en unidades internacionales (UI). Por ejemplo, el NIBSC suministra el 'Tetanus Toxoid Adsorbed Third International Standard 2000' [83,84], que contiene 469 UI por ampolla. Como una alternativa al sistema de UI, la unidad 'Lf' ("unidades de floculación" o la "dosis de floculación") se define como la cantidad de toxoide que, cuando se mezcla con una Unidad Internacional de antitoxina, produce una mezcla óptima de floculación [80]. Por ejemplo, el NIBSC proporciona el Primer reactivo de referencia internacional para el toxoide del tétanos para el ensayo de floculación' [85] que contiene 1000 LF por ampolla.

25 Las composiciones incluirán típicamente entre 5 y 50 Lf de toxoide de la difteria, típicamente aproximadamente 50 Lf.

30 Por mediciones de UI, las composiciones incluirán típicamente al menos 40 UI / dosis.

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

Antígenos de la tos ferina

35 *Bordetella pertussis* provoca la tos ferina. Los antígenos de Pertussis en las vacunas son celulares (células enteras, en forma de células de *B. pertussis* inactivadas) o acelulares. La preparación de antígenos de pertussis celulares está bien documentado [por ejemplo, véase el capítulo 21 de ref. 1] por ejemplo, se puede obtener mediante inactivación por calor de cultivo en fase I de *B. pertussis*. Como una alternativa, sin embargo, se pueden usar antígenos acelulares.

40 Cuando se usan antígenos acelulares, se prefiere utilizar uno, dos o (preferiblemente) tres de los siguientes antígenos: (1) toxina pertussis destoxificada (toxoide de pertussis, o 'TP'); (2) hemaglutinina filamentosa ("FHA"); (3) pertactina (también conocida como la "proteína de membrana externa de 69 kiloDalton "). Estos tres antígenos se preparan preferiblemente por aislamiento de cultivo de *B. pertussis* en crecimiento en medio líquido Stainer-Scholte modificado. TP y FHA pueden aislarse del caldo de fermentación (por ejemplo, por adsorción en gel de hidroxipatita), mientras que la pertactina se pueden extraer de las células por tratamiento térmico y floculación (por ejemplo, utilizando cloruro de bario). Los antígenos pueden purificarse en etapas cromatográficas y/o de precipitación sucesivas. TP y FHA pueden purificarse mediante, por ejemplo , cromatografía hidrofóbica, cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño. La pertactina puede purificarse mediante, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofoba y cromatografía de exclusión por tamaño. FHA y pertactina se pueden tratar con formaldehído antes de usar de acuerdo con la invención. TP puede destoxificarse mediante tratamiento con formaldehído y / o glutaraldehído. Como alternativa a este procedimiento de destoxificación química, la TP puede ser un mutante de TP en el que la actividad enzimática se ha reducido mediante mutagénesis [86], pero la desintoxicación mediante tratamiento químico es más usual.

50 Los antígenos de pertussis acelulares pueden ser adsorbidos sobre uno o más adyuvantes de sales de aluminio. Como alternativa, se pueden añadir en un estado no adsorbido. Cuando se añade pertactina, preferentemente ya se

ha adsorbido sobre un adyuvante de hidróxido de aluminio. PT y FHA pueden ser adsorbidos sobre un adyuvante de hidróxido de aluminio o un fosfato de aluminio. La adsorción de todos TP, FHA y pertactina al hidróxido de aluminio es útil.

Las composiciones incluirán típicamente: 1-50 µg/dosis de TP; 1-50 µg / dosis de FHA; y 1-50 µg de pertactina.

- 5 Además de TP, FHA y pertactina, es posible incluir fimbrias (por ejemplo, los aglutinógenos 2 y 3) en una vacuna contra la tos ferina acelular.

Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

10 El virus de la hepatitis B (HBV) es uno de los agentes conocidos que causa hepatitis viral. El virión del HBV consta de un núcleo interno rodeado por una proteína externa o cápsida, y el núcleo viral contiene el genoma de ADN del virus. El componente principal de la cápsida es una proteína conocida como antígeno de superficie del HBV o, más habitualmente, 'HBsAg', que normalmente es un polipéptido de 226 aminoácidos con un peso molecular de 24 kDa. Todas las vacunas para la hepatitis B existentes contienen HBsAg y, cuando este antígeno se administra a un vacunado normal, estimula la producción de anticuerpos anti-HBsAg, que protegen contra la infección por HBV.

15 Para la fabricación de vacunas, el HBsAg se ha realizado de dos modos: El primer procedimiento implica purificar el antígeno en forma particulada a partir del plasma de portadores de hepatitis B crónica, ya que se sintetizan grandes cantidades de HBsAg en el hígado y se liberan en la corriente sanguínea durante una infección del HBV. El segundo modo implica expresar la proteína mediante procedimientos de ADN recombinante. El HBsAg para usar con el procedimiento de la invención se expresa, preferentemente, de forma recombinante en células de levadura. Las levaduras adecuadas incluyen, por ejemplo, los huéspedes *Saccharomyces* (como *S. cerevisiae*) o *Hansenula* (como *H. polymorpha*).

20 El HBsAg está preferiblemente no glicosilado. Al contrario que el HBsAg nativo (es decir, como en el producto purificado de plasma), el HBsAg que se expresa en levaduras está, en general, no glicosilado y esta es la forma más preferida de HBsAg para uso con la invención, porque es altamente inmunógeno y puede prepararse sin el riesgo de contaminación del producto sanguíneo.

25 El HBsAg estará generalmente en forma de partículas sustancialmente esféricas (diámetro promedio de aproximadamente 20 nm), incluida una matriz lipídica que comprende fosfolípidos. Las partículas de HBsAg expresado en levaduras puede incluir fosfatidilinositol, que no se encuentra en los viriones de HBV naturales. Las partículas pueden también incluir una cantidad no tóxica de LPS con el fin de estimular el sistema inmunitario [87]. El HBsAg preferido está en la forma de partículas que incluyen una matriz lipídica que comprende fosfolípidos, fosfatidilinositol y polisorbato 20.

30 Todos los subtipos conocidos de HBV contienen el determinante común 'un'. Combinado con otros determinantes y subdeterminantes, se han identificado nueve subtipos: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr_q- y adr_q+. Además de estos subtipos, han emergido otras variantes, como mutantes de HBV que han sido detectados en individuos inmunizados ("mutantes de escape"). El subtipo de HBV habitual con la invención es el subtipo adw2.

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

Las cantidades de HBsAg se expresan típicamente en microgramos, y una cantidad típica de HBsAg por dosis de vacuna es de entre 5 y 5 µg por ejemplo 10 µg / dosis.

40 Aunque el HBsAg puede estar adsorbido a un adyuvante de hidróxido de aluminio en la vacuna final (como en el conocido producto *ENGERIX-B*), o puede permanecer no adsorbido, por lo general estará adsorbido a un adyuvante de fosfato de aluminio [88].

Vacuna inactivada contra el virus de la polio

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

45 Los poliovirus pueden cultivarse en cultivo celular y un cultivo preferido usa una línea celular Vero, derivada de riñón de mono. Las células Vero pueden cultivarse de manera conveniente en microvehículos. Después del crecimiento, los viriones pueden purificarse mediante técnicas tales como ultrafiltración, diafiltración y cromatografía. Antes de la administración a los pacientes, los virus de la polio deben ser inactivados y esto se puede lograr mediante tratamiento con formaldehído.

50 La poliomiелitis puede estar causada por uno de tres tipos de poliovirus. Los tres tipos son similares y causan síntomas idénticos, pero son antigénicamente muy diferentes y la infección por un tipo no protege contra la infección por los otros. Se prefiere, por lo tanto, usar tres antígenos de poliovirus en la invención: poliovirus de Tipo 1 (por ejemplo, cepa Mahoney), poliovirus de Tipo 2 (por ejemplo, cepa MEF-1) y poliovirus de Tipo 3 (por ejemplo cepa

Saukett). Los virus preferiblemente se cultivan, purifican e inactivan individualmente y después se combinan para dar una mezcla trivalente a granel para el uso con la invención.

- 5 Las cantidades de IPV se expresan típicamente en la unidad 'UD' (la "unidad de D-antígeno" [89]). Es habitual usar entre 1-100 UD por tipo viral por dosis, por ejemplo, aproximadamente 80 UD del poliovirus de Tipo 1, aproximadamente 16 UD del poliovirus de Tipo 2, y aproximadamente 64 UD de poliovirus de tipo 3.

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

Antígenos del virus de la hepatitis A

- 10 El virus de la hepatitis A (VHA) es uno de los agentes conocidos que causa hepatitis viral. Las vacunas contra el VHC se divulgan en el capítulo 15 de la referencia 1. Un componente útil del VHA se basa en el virus inactivado, y la inactivación se puede lograr mediante tratamiento con formalina. Los virus pueden cultivarse en fibroblastos diploides de pulmón embrionario humano, tales como células MRC-5. Una cepa útil del VHA es HM175, aunque también se puede utilizar CR326F. Las células pueden cultivarse en condiciones que permitan el crecimiento viral.
- 15 Las células se lisan y la suspensión resultante pueden purificarse mediante ultrafiltración y cromatografía de permeación en gel.

La cantidad de antígeno del VHA medida en UE (Unidades ELISA), es típicamente al menos aproximadamente 500 UE / ml.

Sacáridos neumocócicos

- 20 Los antígenos neumocócicos conjugados comprenden antígenos sacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* conjugados con proteínas vehículo [por ejemplo, referencias 90 a 92]. Es normal para incluir sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*: las mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes se utilizan ampliamente, como son vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [93]. Por ejemplo, PREVNAR™ [94] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F) con cada sacárido conjugado individualmente con CRM197 mediante aminación reductora, con 2 µg de cada sacárido por dosis de 0,5 ml (4 µg de serotipo 6B).
- 25

- Las composiciones de la invención pueden incluir antígenos sacáridos para al menos los serotipos 6B, 14, 19F y 23F. Los serotipos adicionales se pueden seleccionar de: 1, 3, 4, 5, 7F, 9V y 18C. La cobertura de los serotipos neumocócicos heptavalentes (como en PREVNAR™), nonavalentes (por ejemplo los 7 serotipos de PREVNAR, más 1 y 5), decavalentes (por ejemplo los 7 serotipos de PREVNAR, más 1, 5 y 7F) y undecavalentes (por ejemplo, los 7 serotipos de PREVNAR, más 1, 3, 5, y 7F) es particularmente útil.
- 30

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

General

- 35 El término "que comprende" abarca (que incluye" además de "constituido por", *por ejemplo* una composición "que comprende" X puede estar constituido sólo por X o puede incluir algo adicional, *por ejemplo* X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", *por ejemplo*, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

- 40 El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

A menos que se indique específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Por tanto, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, dos componentes se pueden combinar entre sí y, después, la combinación puede combinarse con el tercer componente, *etc.*

- 45 Las concentraciones de los conjugados se definen en el presente documento en términos de masa de sacárido, con el fin de evitar la variación debida a la elección del vehículo.

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

Cuando se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deberán obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (EST) y, en particular, libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB).

Modos para realizar la invención

5 Los conjugados de sacárido meningocócico se han preparada como se describe en la referencia 22. Los conjugados de cada uno de los serogrupos A, C, W135 e Y se han combinado sin adyuvante para dar una mezcla meningocócica conjugada tetravalente. Esta mezcla puede ser liofilizada en presencia de un estabilizador, tal como una mezcla sacarosa / manitol, para dar un componente meningocócico liofilizado que se puede reconstituir cuando sea necesario en el futuro. El material liofilizado se llena en viales, en una cantidad que proporcionará 5 µg de cada sacárido (10 µg de serogrupo A) después de la reconstitución.

10 La vacuna HIBTITER™ (Wyeth) y Liquid PedvaxHIB™ se compran. La vacuna HIBTITER™ no está adyuvada, mientras que Liquid PedvaxHIB™ contiene un adyuvante de sal de aluminio. Ambas vacunas se suministran en viales de vidrio.

15 El contenido de un vial de vidrio se extraen en una jeringuilla a través de una aguja y se inyectan en un vial que contiene material liofilizado. Después de mezclado suave, el contenido se eliminan a través de una aguja en una jeringuilla nueva. La aguja de la jeringuilla se reemplaza con una aguja de inyección y la vacuna reconstituida se inyecta en un sujeto de ensayo.

20 En los estudios iniciales de los animales, se utilizan ocho grupos de diez ratones CD1. El grupo 1 recibe una vacuna conjugada de MenACWY preparada mediante la mezcla del conjugado MenA liofilizado con una mezcla de MenCWY líquido, tal como se describe en la referencia 22. El Grupo 2 recibe una vacuna de MenACWY preparada mediante la reconstitución acuosa de MenACWY liofilizado. Grupos 3 a 5 reciben la misma vacuna en el grupo 2, pero reconstituido con: (3) un conjugado Hib-OMPC con adyuvante de aluminio sulfato hidroxifosfato, *por ejemplo* PEDVAXHIB™; (4) un conjugado de CRM197-Hib adsorbido en fosfato de aluminio; o (5) un conjugado CRM197-Hib no adsorbido, por ejemplo HIBTITER™. Estas tres vacunas de Hib líquidas se administran sin conjugados meningocócicos a los grupos 6 a 8 para que coincida con los grupos 3 a 5, respectivamente. Las vacunas se administran por vía subcutánea en volúmenes de 200 µl los días 0, 14 y 28. Las dosis son 1 µg de sacárido de MenCWY, 2 µg de sacárido MenA y 2,5 µg de sacárido Hib. Los sueros extraídos los días 0, 28 y 42 se analizan para determinar su actividad bactericida contra las cepas de meningococo y para las respuestas anti-PRP. En las variantes de estos experimentos, el grupo 4 recibe un conjugado CRM197-Hib que está adyuvado pero no adsorbido en fosfato de aluminio

30 En el estudio SS-07-02, los resultados de inmunogenicidad después de tres dosis fueron los siguientes, expresados como el % de respondedores para los cinco conjugados y también, para los conjugados meningocócicos, como los títulos medios geométricos (GMT).

	MenA		MenC		MenW135		MenY		Hib
	MGT	%	MGT	%	MGT	%	MGT	%	%
1	272	100	154	100	146	100	111	100	-
2	656	100	239	100	106	100	233	100	-
3	1882	100	1533	100	1380	100	530	100	37,5
4	116	87,5	205	100	231	100	91	87,5	87,5
5	111	100	70	87,5	66	75	38	75	75
6	-	-	-	-	-	-	-	-	50
7	-	-	-	-	-	-	-	-	62,5
8	-	-	-	-	-	-	-	-	50

35 Por tanto, la combinación de Hib líquido con MenACWY liofilizado puede dar una composición que conserva la eficacia contra las cinco bacterias. Se ven buenos resultados en el grupo 3 (reconstitución con un conjugado de Hib líquido con un adyuvante de sulfato de hidroxifosfato de aluminio) y el grupo 4 (reconstitución con un conjugado Hib de líquido con un adyuvante de fosfato de aluminio). El Grupo 3 dio los títulos de anti-meningocócicos más altos, con 100 % respondedores contra todos los serogrupos, pero solo tuvo un modesto número de respondedores al antígeno

Hib. La mejor respuesta anti-Hib se observó en el grupo 4, y las respuestas anti-meningocócicas también fueron razonables, en particular contra el serogrupo W135 [3].

5 Los grupos 3 y 4 también mostraron buenas respuestas inmunes después de dos dosis (datos no mostrados) y las respuestas anti-MenY, en particular, fueron más altas en estos dos grupos que en los grupos 1, 2 o 5 (tanto en términos de GMT como de % de respondedores). El grupo 4 mostró los títulos anti-meningocócicos más altos después de 2 dosis con 100 % respondedores contra todos los serogrupos.

10 En los grupos 4 y 5, la presencia de los conjugados meningocócicos aumentó las respuestas inmunes contra el sacárido Hib (compárese el grupo 8 con el grupo 5, y el grupo 7 con el grupo 4). En los grupos 3 y 4, en los que el antígeno Hib líquido estaba adyuvado, la presencia del conjugado de Hib aumentó los títulos anti-W135 (en comparación con el grupo 2), pero esta mejora no se observó en el grupo 5, usando Hib sin adyugar.

En experimentos paralelos, los conjugados se reconstituyeron utilizando una emulsión de escualeno en agua (MF59). Tres grupos (9 a 11) recibieron: 9) conjugados MenACWY liofilizados, (10) un conjugado CRM197-Hib o (11) una mezcla de los dos. Los resultados de inmunogenicidad después de 3 dosis fueron los siguientes:

	MenA		MenC		MenW135		MenY		Hib
	MGT	%	MGT	%	MGT	%	MGT	%	%
2 y 8	656	100	239	100	106	100	233	100	50
9	1011	100	501	100	423	100	501	100	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	87,5
11	1470	100	600	100	640	100	374	100	100

15 Por tanto, la emulsión de escualeno en agua mejora la eficacia de los conjugados meningocócicos y de Hib, con la combinación de MenACWY + Hib + emulsión ofrecen una excelente inmunogenicidad.

20 Los estudios de estabilidad en los conjugados de sacáridos de Hib y MenA en los productos combinados 4 y 5 también se realizaron mediante RMN en un periodo de 24 horas a temperatura ambiente. Ambos de estos sacáridos contienen enlaces fosfodiéster y, por tanto, son susceptibles a la descomposición hidrolítica durante el almacenamiento en forma acuosa. Después de la reconstitución de la mezcla de MenA-CWY liofilizada con Hib líquido, sin embargo, los sacáridos tanto MenA como Hib permanecieron completamente estables en presencia o ausencia de un adyuvante de fosfato de aluminio, sin despolimerización detectable.

Debe entenderse que la invención se ha descrito únicamente a modo de ejemplo y que se pueden realizar modificaciones permaneciendo dentro del alcance de la invención reivindicada.

25 **Referencias**

[1] Vaccines. (eds. Plotkin & Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.

[2] Documento WO02/00249.

[3] Documento WO2005/032583

[4] Ramsay et al. (2001) Lancet 357(9251):195-196.

30 [5] Lindberg (1999) Vaccines 17 Suppl 2:S28-36.

[6] Buttery & Moxon (2000) JR Coll Physicians Lond 34:163-168.

[7] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii.

[8] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567.

[9] Patente europea 0477508.

35 [10] Patente de EE.UU. 5.306.492.

[11] Documento WO98/42721.

[12] Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114.

- [13] Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 or 012342335X.
- [14] Documento WO97/00697.
- [15] Kanra et al. (1999) The Turkish Journal of Paediatrics 42:421-427.
- [16] Ravenscroft et al. (2000) Dev Biol (basel) 103: 35-47.
- 5 [17] W.H.O. Tech. Rep. Ser. 594:51, 1976.
- [18] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2:47-49.
- [19] Costantino et al. (1992) Vaccine 10:691-8.
- [20] Lieberman et al. (1996) JAMA 275:1499-503.
- [21] Documento WO02/058737.
- 10 [22] Documento WO03/007985.
- [23] Rennels et al. (2002) Pediatr Infect Dis J 21:978-979.
- [24] Campbell et al. (2002) J Infect Dis 186:1848-1851.
- [25] Documento WO03/080678.
- [26] Glode et al. (1979) J Infect Dis 139:52-56
- 15 [27] Documento WO94/05325; patente de EE.UU. 5.425.946.
- [28] Documento Arakere & Frasch (1991) Infect. Immun. 59:4349-4356.
- [29] Michon et al. (2000) Dev. Biol. 103:151-160.
- [30] Rubinstein & Stein (1998) J. Immunol. 141:4357-4362.
- [31] Documento WO2005/033148
- 20 [32] Documento WO2007/000314.
- [33] Documento WO2007/000327.
- [34] Documento WO2007/000322.
- [35] Anonymous (Jan 2002) Research Disclosure, 453077.
- [36] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.
- 25 [37] Anderson et al. (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.
- [38] Documento EP-A-0372501.
- [39] Documento EP-A-0378881.
- [40] Documento EP-A-0427347.
- [41] Documento WO93/17712
- 30 [42] Documento WO94/03208.
- [43] Documento WO98/58668.
- [44] Documento EP-A-0471177.
- [45] Documento WO91/01146
- [46] Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
- 35 [47] Baraldo et al. (2004) Infect Immun 72(8):4884-7.
- [48] Documento EP-A-0594610.
- [49] Ruan et al. (1990) J Immunol 145:3379-3384.

- [50] Documento WO00/56360.
- [51] Kuo et al. (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [52] Documento WO02/091998.
- [53] Documento WO01/72337
- 5 [54] Documento WO00/6176.
- [55] Documento WO2007/000341.
- [56] Documento WO96/40242
- [57] Lees et al. (1996) *Vaccine* 14:190-198.
- [58] Documento WO95/08348.
- 10 [59] Patente de EE.UU. 4.882.317.
- [60] Patente de EE.UU. 4.695.624.
- [61] Porro et al. (1985) *Mo/ Immunol* 22:907-919.
- [62] Documento EP-A-0208375
- [63] Documento WO00/10599
- 15 [64] Gever et al. *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).
- [65] Patente de EE.UU. 4.057.685.
- [66] Patentes de EE.UU. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [67] Patente de EE.UU. 4.459.286.
- [68] Patente de EE.UU. 4.965.338.
- 20 [69] Patente de EE.UU. 4.663.160.
- [70] Documento WO2007/000343.
- [71] Patente de EE.UU. 4.761.283.
- [72] Patente de EE.UU. 4.356.170.
- [73] Documento WO2007/000342.
- 25 [74] Lei et al. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
- [75] Documento WO00/38711; patente de EE.UU. 6.146.902.
- [76] Gennaro (2000) Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [77] *Vaccine Deign: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- 30 [78] Sesardic et al. (2001) *Biologicals* 29:107-22.
- [79] Código NIBSC: 98/560.
- [80] Module 1 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Galazka).
- [81] Código NIBSC: 69/017.
- [82] Código NIBSC: DIFT.
- 35 [83] Sesardic et al. (2002) *Biologicals* 30:49-68.
- [84] Código NIBSC: 98/552.
- [85] Código NIBSC: TEFT.

- [86] Rappuoli et al. (1991) TIBTECH9:232-238.
- [87] Vanlandschoot et al. (2005) J Gen Virol 86:323-31.
- [88] Documento WO93/24148.
- [89] Module 6 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Robertson)
- 5 [90] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [91] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [92] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [93] Zielen et al. (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.
- [94] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
- 10 [95] Documento WO99/056776.
- [96] Documento US-2007/0014805.
- [97] Documento WO2007/080308.
- [98] Suli et al. (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.
- [99] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- 15 [100] Hariharan et al. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- [101] Documento WO95/11700.
- [102] Patente de EE.UU. 6.080.725.
- [103] Documento WO2005/097181
- [104] Documento WO2006/113373

20

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende: (i) un componente acuoso, que comprende un conjugado de un sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo B a una concentración en el intervalo de 0,5 µg/ml a 50 µg/ml, y (ii) un componente liofilizado, que comprende conjugados de sacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, en el que la cantidad de los sacáridos meningocócicos por serogrupo está entre 1 µg y 20 µg.
2. Un procedimiento para preparar una vacuna combinada, que comprende la etapa de combinar (i) un componente acuoso, que comprende un conjugado de un sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo B a una concentración en el intervalo de 0,5 µg/ml a 50 µg/ml, y (ii) un componente liofilizado, que comprende conjugados de sacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, en el que la cantidad de los sacáridos meningocócicos por serogrupo está entre 1 mg y 20 µg.
3. Una vacuna combinada que comprende: (i) un sacárido capsular conjugado de *Haemophilus influenzae* de tipo B a una concentración en el intervalo de 0,5 µg/ml a 50 µg/ml; y (ii) conjugados de sacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* de los serogrupos A, C, W135 e Y meningocócicos, preparados mediante la combinación de un conjugado de *H.i nfluensae* y conjugados liofilizados de *N. meningitidis*, en el que la cantidad de los sacáridos meningocócicos por serogrupo está entre 1 µg y 20 µg.
4. El kit, el procedimiento o la vacuna de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente acuoso incluye un adyuvante.
5. El kit, el procedimiento o la vacuna de cualquier reivindicación precedente, en el que el conjugado de *H. influenzae* conjugado es adsorbido en fosfato de aluminio.
6. El kit, el procedimiento o la vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el componente acuoso no está adyuvado.
7. El kit, el procedimiento o la vacuna de cualquier reivindicación precedente, en el que la administración del conjugado de *H. influenzae* da lugar a una concentración de anticuerpo anti-PRP en un paciente de >0,15 µg/ml.
8. El kit, el procedimiento o la vacuna de cualquier reivindicación precedente, en el que el sacárido de *H. influenzae* se conjuga a una proteína transportadora seleccionada del grupo que consiste de CRM197, toxoide del tétanos y el complejo de membrana externa de *N. meningitidis*.
9. El kit o procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente acuoso comprende uno o más de: un toxoide de la difteria, un toxoide del tétanos, el antígeno(s) de tos ferina acelular, los antígenos inactivados del virus de la polio, el antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B, y / o el sacárido neumocócico.
10. El kit, el procedimiento o la vacuna de cualquier reivindicación precedente, en el que la administración del o los conjugados de *N. meningitidis* da como resultado una respuesta de anticuerpos bactericida.
11. El kit, el procedimiento o la vacuna de cualquier reivindicación precedente, en el que el sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo B y los sacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* están conjugados con una toxina o toxoide bacteriano.
12. El kit, el procedimiento o la vacuna de cualquier reivindicación precedente, en el que el o los sacáridos de *N. meningitidis* está / están conjugados a una proteína transportadora seleccionada del grupo que consiste en CRM197, toxoide de la difteria y toxoide del tétanos.
13. El kit, el procedimiento o la vacuna de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente liofilizado incluye un estabilizante.
14. El kit, el procedimiento o la vacuna de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente liofilizado incluye un adyuvante.
15. El kit, el procedimiento o la vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el componente liofilizado no incluye adyuvante.
16. El kit, el procedimiento o la vacuna de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente liofilizado no incluye un sacárido de Hib.
17. . La vacuna de cualquier reivindicación precedente, que incluye uno o más tampones.

- 18.** La vacuna de cualquier reivindicación precedente, en el que la vacuna comprende uno o más de: un toxoide de la difteria, un toxoide del tétanos, el antígeno(s) de tos ferina acelular, los antígenos inactivados del virus de la polio, el antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B, y / o el sacárido neumocócico.
- 19.** La vacuna de cualquier reivindicación precedente para usar como medicamento.