

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 807**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2011 PCT/IB2011/052275**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO2011151760**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2011 E 11728059 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2575870**

54 Título: **Formulaciones vacunales**

30 Prioridad:

04.06.2010 US 351804 P

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

02.06.2017

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**KHANDKE, LAKSHMI y
RASHIDBAIGI, ABBAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 614 807 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

Formulaciones vacunales

Antecedentes de la invención

5 La enfermedad neumocócica causada por la bacteria *Streptococcus pneumoniae* (también conocida como
neumococo) es uno de los patógenos bacterianos más importantes a nivel mundial. La carga de la enfermedad es
alta en los niños menores de cinco años de los países en desarrollo, donde no se dispone de la vacuna. La
enfermedad neumocócica es un grupo complejo de enfermedades, e incluye infecciones invasivas tales como
bacteriemia/sepsis, meningitis, neumonía y otitis media, que afecta a niños y adultos. Prevnar 13 (también conocido
10 como "Prevenar 13" y denominada en el presente documento "Prev(e)nar 13") es una formulación de polisacáridos
de trece serotipos de neumococos (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F)), que se conjugan
individualmente a CRM₁₉₇ (material de reactividad cruzada de una cepa mutante de *Corynebacterium diphtheriae*).
Prev(e)nar 13 se recomienda para la inmunización activa de lactantes y niños pequeños para proporcionar la
cobertura más amplia de serotipos de cualquiera de las vacunas de conjugados de neumococos. En particular, el
15 serotipo 19A de Prev(e)nar 13 prevalece en muchas regiones del mundo y, a menudo, se asocia con la resistencia a
los antibióticos. Véanse, por ejemplo, los documentos WO2006/110381; WO2008/079653; WO2008/079732;
WO2008/143709 y las referencias citadas en los mismos.

El Timerosal (también conocido como tiomersal; mertiolato) es un conservante que contiene etilmercurio que, desde
principios de la década de los 30 del siglo pasado, se ha añadido a muchas formulaciones inyectables multidosis y
soluciones tópicas para protegerlas de la posible contaminación durante la exposición y cuando se administran a
20 múltiples sujetos. El Timerosal se sigue administrando como parte de las vacunas obligatorias y en otros productos
farmacéuticos en Estados Unidos y en el resto del mundo. Se ha afirmado que es un conservante eficaz para
eliminar las posibles bacterias contaminantes durante el uso múltiple de productos en el campo, con una mínima
interacción con la estructura antigénica y las propiedades de las vacunas. Debido a las controversias en aumento
relativas a los posibles problemas de seguridad y los efectos adversos de etilmercurio en el desarrollo del cerebro de
25 los bebés y de los jóvenes, algunos organismos comenzaron a recomendar la identificación de conservantes
alternativos con un riesgo de seguridad más bajo o irrelevante. En 1999, una revisión de la FDA estadounidense
dispuesta por el Congreso de EE.UU. encontró que algunos bebés podrían recibir más mercurio de las vacunas de
lo que se consideraba aceptable de acuerdo con ciertas pautas nacionales. La Academia Americana de Pediatría
(AAP) y el Servicio de Salud Pública de Estados Unidos (USPHS) emitieron una declaración conjunta sobre el
30 Timerosal en las vacunas y, a continuación, la AAP publicó un informe provisional destinado a los médicos,
recomendando la retirada del Timerosal de las vacunas lo antes posible, manteniendo al mismo tiempo los esfuerzos
en garantizar que se siguieran aplicando altos niveles de vacunación en todo el mundo sin afectar a la seguridad.

Los documentos WO00/56360 y WO00/62801 desvelan una formulación de conjugado neumocócico, especialmente,
una formulación 11-valente usando proteína D como proteína vehículo.

35 La necesidad de añadir conservantes a las vacunas se puede reducir o evitar mediante la fabricación y el uso de
formulaciones vacunales de una sola dosis. Sin embargo, el uso de formulaciones sin conservantes monodosis
eleva el coste global de la vacunación y pone en peligro la eficacia de los programas de inmunización en los países
en desarrollo. Además, la retirada por completo de los conservantes de los viales multidosis no se ve como una
buena opción, especialmente en países con almacenamiento en frío limitado y estándares subóptimos de atención
40 sanitaria (Drain y col., *Bull World Health Organ* 81(10): 726-731 (2003). En 1928, doce de 21 niños inoculados con
una vacuna contra la difteria contaminada murieron de múltiples abscesos de estafilococos y toxemia (Wilson, "The
Hazards of Immunization", Athlone Press, Londres. pág. 75-78 (1967). Por lo tanto, aunque los viales multidosis
parecen ser los más apropiados para la producción de vacunas menos costosas, es deseable formular vacunas
multidosis con al menos un conservante para proteger a los sujetos de los microorganismos introducidos
45 inadvertidamente en la vacuna durante los múltiples usos, o después de una o más acciones no estériles. La eficacia
de los conservantes en la resistencia a las contaminaciones bacterianas y de otros microorganismos se debe
equilibrar, no obstante, con el efecto que un determinado conservante tenga en la inmunogenicidad, así como en la
estabilidad a largo plazo de cada determinante antigénico diferente de una composición inmunogénica de elección.
La compatibilidad de las formulaciones Prev(e)nar 13 con los conservantes no se ha abordado con anterioridad.
50 Sería deseable contar con una formulación optimizada que comprendiera al menos un conservante que protegiera
y/o estabilizara determinantes antigénicos de los serotipos de antígenos de neumococos presentes en el Prev(e)nar
13

Sumario de la invención

55 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunogénica multivalente que
comprende conjugados de polisacárido-proteína que consisten en polisacáridos capsulares de neumococos de los
serotipos de *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F conjugados
individualmente con CRM₁₉₇, y que comprende además 2-fenoxietanol (2-PE) a una concentración de entre 7 mg/ml
y 15 mg/ml.

La composición comprende 2-PE a una concentración de entre 7 mg/ml y 15 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, no menos de 7 mg/ml o no menos de 10 mg/ml.

5 Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden, en ciertas realizaciones, comprender, además, uno o más de un adyuvante, un tampón, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico y un inhibidor de la oxidación de radicales libres. En ciertas realizaciones, el adyuvante es fosfato de aluminio.

10 Una composición inmunogénica multivalente preferida de la invención es una formulación de polisacáridos capsulares de neumococos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, conjugados individualmente a CRM₁₉₇, estando la composición inmunogénica multivalente formulada en un líquido estéril que comprende: aproximadamente 4,4 µg/ml de cada polisacárido, a excepción de 6B, a aproximadamente 8,8 µg/ml; aproximadamente 58 µg/ml de proteína vehículo CRM₁₉₇; aproximadamente 0,25 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio; cloruro de sodio al aproximadamente 0,85 %; polisorbato 80 al aproximadamente 0,02 %; tampón de succinato de sodio aproximadamente 5 mM a un pH de 5,8; y aproximadamente 10 mg/ml de 2-fenoxietanol.

15 En ciertas realizaciones de la invención, la antigenicidad de la composición inmunogénica es estable durante no menos de 1 año, 1,5 años, 2 años o 2,5 años a una temperatura de 2-8 °C, 20-25 °C o 37 °C.

20 En ciertas realizaciones de la invención, tras la inoculación de la composición inmunogénica con uno o más microorganismos, la concentración de dichos microorganismos se reduce con el tiempo. En ciertas realizaciones, tras la inoculación con una o más cepas bacterianas, la composición presenta una reducción logarítmica de al menos 1,0 con respecto al recuento inicial de microorganismos a las 24 horas, una reducción logarítmica de al menos 3,0 a los 7 días con respecto al valor anterior medido y un aumento logarítmico no superior a 0,5 tras 28 días con respecto al valor anterior medido. En ciertas realizaciones, tras la inoculación con una o más cepas bacterianas, la composición presenta una reducción logarítmica de al menos 2,0 con respecto al recuento inicial calculado a las 6 horas de la inoculación, una reducción logarítmica de al menos 3,0 con respecto al valor anterior medido a las 24 horas y ninguna recuperación a los 28 días. Las cepas de microorganismos incluyen una o más cepas seleccionadas entre *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*.

25 En ciertas realizaciones, la composición inmunogénica se inocula varias veces. En ciertas realizaciones, se produce una segunda inoculación a las 6 horas de la inoculación inicial, se produce una tercera inoculación a las 24 horas de la inoculación inicial, se produce una tercera inoculación a los 7 días de la inoculación inicial y se produce una cuarta inoculación a los 14 días de la inoculación inicial.

30 En un segundo aspecto, la presente invención también proporciona un vial que contiene una composición inmunogénica multivalente de la invención. Un vial puede contener una sola dosis o más de una dosis de la composición inmunogénica. La invención también proporciona un dispositivo de administración de vacuna precargado que comprende una composición inmunogénica multivalente de la invención. En ciertas realizaciones, el dispositivo de administración de vacuna precargado es o comprende una jeringa. Los dispositivos de administración de vacuna de la invención pueden comprender una jeringa de cámara doble o múltiple, o viales o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el dispositivo de administración de vacuna precargado comprende una composición inmunogénica multivalente formulada para la inyección intramuscular o subcutánea.

35 En un tercer aspecto, la presente invención también proporciona un kit para preparar una composición inmunogénica multivalente de la invención, en el que el kit comprende (i) una pluralidad de polisacáridos capsulares en una forma liofilizada de la composición; y (ii) material acuoso para reconstituir el componente (i) con el fin de proporcionar la composición acuosa.

40 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una vacuna multidosis que comprende cuatro dosis de una vacuna en un vial, comprendiendo cada dosis de 4 a 20 mg/ml, preferentemente 10 mg/ml de 2-fenoxietanol, siendo una dosis 0,5 ml de vacuna.

45 La presente divulgación también proporciona un procedimiento de medición de la eficacia de una formulación de vacuna que comprende uno o más agentes conservantes seleccionados en presencia de algunos o todos los componentes inmunogénicos y no inmunogénicos de la composición vacunal, comprendiendo el ensayo al menos dos etapas de inoculación de la composición de ensayo con una población de microorganismos seleccionada y comparación de la reducción logarítmica del/de los microorganismo/s inoculado/s en el tiempo y en determinadas condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura) con la reducción logarítmica en una composición de control que carece del/de los conservante/s de ensayo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 - Eficacia del Timerosal como conservante vacunal en diversas formulaciones.

55 **Figura 2** - Eficacia y estabilidad del 2-fenoxietanol (2-PE) como conservante vacunal en diversas formulaciones y a diversas concentraciones.

Figura 3 - Evolución en el tiempo de la reducción del recuento de colonias de microorganismos en la formulación de vacuna Prev(e)nar 13 sin conservantes a 20-25 °C tras una sola exposición a los microorganismos

(expresada como el log₁₀ del cambio medio en comparación con la duración de la exposición en t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días, 14 días y 28 días).

Figura 4 - Evolución en el tiempo de la reducción del recuento de colonias de microorganismos en la formulación de vacuna Prev(e)nar 13 con Timerosal al 0,01 % a 20-25 °C tras una sola exposición a los microorganismos (expresada como el log₁₀ del cambio medio en comparación con la duración de la exposición en t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días, 14 días y 28 días).

Figura 5 - Evolución en el tiempo de la reducción del recuento de colonias de microorganismos en la formulación de vacuna Prev(e)nar 13 con Timerosal al 0,02 % a 20-25 °C tras una sola exposición a los microorganismos (expresada como el log₁₀ del cambio medio en comparación con la duración de la exposición en t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días, 14 días y 28 días).

Figura 6 - Evolución en el tiempo de la reducción del recuento de colonias de microorganismos en solución salina con Timerosal al 0,02 % a 20-25 °C tras una sola exposición a los microorganismos (expresada como el log₁₀ del cambio medio en comparación con la duración de la exposición en t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días, 14 días y 28 días).

Figura 7 - Evolución en el tiempo de la reducción del recuento de colonias de microorganismos en la formulación de vacuna Prev(e)nar 13 con 5 mg/0,5 ml de 2-fenoxietanol a 20-25 °C tras una sola exposición a los microorganismos (expresada como el log₁₀ del cambio medio en comparación con la duración de la exposición en t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días, 14 días y 28 días).

Figura 8 - Evolución en el tiempo de la reducción del recuento de colonias de microorganismos en la formulación de vacuna Prev(e)nar 13 sin conservante a (A) 22-24 °C o a (B) 2-8 °C, tras múltiples desafíos de microorganismos a t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días y 14 días (expresada como el log₁₀ del cambio medio en comparación con la duración de la exposición en t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días, 14 días y 28 días).

Figura 9 - Evolución en el tiempo de la reducción del recuento de colonias de microorganismos en la formulación de vacuna Prev(e)nar 13 con Timerosal al 0,01 % a (A) 22-24 °C o a (B) 2-8 °C, tras múltiples desafíos de microorganismos a t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días y 14 días, (expresada como el log₁₀ del cambio medio en comparación con la duración de la exposición en t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días, 14 días y 28 días).

Figura 10 - Evolución en el tiempo de la reducción del recuento de colonias de microorganismos en la formulación de vacuna Prev(e)nar 13 con Timerosal al 0,02 % a (A) 22-24 °C o a (B) 2-8 °C tras múltiples desafíos de microorganismos a t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días y 14 días (expresada como el log₁₀ del cambio medio en comparación con la duración de la exposición en t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días, 14 días y 28 días).

Figura 11 - Evolución en el tiempo de la reducción del recuento de colonias de microorganismos en solución salina con Timerosal al 0,02 % a (A) 22-24 °C o a (B) 2-8 °C tras múltiples desafíos de microorganismos a t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días y 14 días (expresada como el log₁₀ del cambio medio en comparación con la duración de la exposición en t = 0, 6 horas, 24 horas, 7 días, 14 días y 28 días).

Figura 12 - Análisis de regresión no lineal de la desintegración de *S. aureus* en diversos estudios de exposición.

Figura 13 - Comparación de 2-PE y Timerosal como un conservante vacunal frente a una o múltiples exposiciones de microorganismos: cumplir o no cumplir los criterios B de EP 5.1.3.

Figura 14 - Estabilidad a largo plazo de la antigenicidad de los preparados de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de cada serotipo en Prev(e)nar 13 formulado con 5 mg de 2-PE.

Figura 15 - Estabilidad a largo plazo de 2-PE en la formulación de vacuna Prev(e)nar 13.

Descripción detallada de la invención

El porcentaje de concentración, como se usa en la presente solicitud, es de peso/volumen (p/v) o de peso/peso (p/p).

A menos que se especifique lo contrario, "dosis" se refiere a una dosis de vacuna de 0,5 ml.

El término "multidosis" se refiere a una composición que comprende más de una dosis de vacuna, que se puede administrar a un sujeto o más de un sujeto en diferentes etapas de administración y a lo largo del tiempo.

La presente invención proporciona una composición inmunogénica multivalente que comprende una pluralidad de polisacáridos capsulares de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* (también conocidos como neumococos) y un conservante. Esta composición también se puede denominar vacuna, y se usa para inducir una respuesta inmune contra el neumococo y para proteger contra la infección en un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, preferentemente un niño humano o un bebé.

Una pluralidad de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* es adecuada para la composición de la presente invención.

Los polisacáridos capsulares se preparan a partir los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae*. Los polisacáridos capsulares de la invención se preparan a partir de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* usando técnicas conocidas. Véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente internacional W02006/110381; W02008/079653; W02008/079732 y W02008/143709.

Los polisacáridos capsulares están conjugados a una proteína vehículo. Estos conjugados de neumococos se pueden preparar por separado. Por ejemplo, en una realización, cada serotipo de polisacárido neumocócico se

cultiva en un medio a base de soja. Los polisacáridos individuales se purifican luego a través de centrifugación, precipitación, ultrafiltración y cromatografía en columna. Los polisacáridos purificados se activan químicamente para que los sacáridos sean capaces de reaccionar con la proteína vehículo seleccionada para formar conjugados de neumococos.

- 5 Una vez activado, cada polisacárido capsular se conjuga por separado a una proteína vehículo para formar un glicoconjugado. En ciertas realizaciones, cada polisacárido capsular diferente se conjuga con la misma proteína vehículo. En dichas realizaciones, la conjugación se puede realizar mediante, por ejemplo, aminación reductora.

La activación química de los polisacáridos y la posterior conjugación a la proteína vehículo se logra mediante medios convencionales. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.673.574 y 4.902.506.

- 10 Las proteínas vehículo son preferentemente proteínas que son no tóxicas y no son reactogénicas, y se pueden obtener en cantidad y pureza suficientes. Las proteínas vehículo deben ser susceptibles a los procedimientos de conjugación convencionales. En la presente invención, se usa CRM₁₉₇ como la proteína vehículo.

- 15 CRM₁₉₇ (Pfizer, Sanford, NC) es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de la toxina diftérica aislada de cultivos de cepa de *Corynebacterium diphtheriae* C7 (CRM₁₉₇) cultivados en casaminoácidos y medio a base de extracto de levadura. CRM₁₉₇ se purifica a través de ultrafiltración, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. Como alternativa, CRM₁₉₇ se prepara de forma recombinante de acuerdo, por ejemplo, con la patente de EE.UU. n.º 5.614.382. Hay otros toxoides diftéricos que también son adecuados para su uso como proteínas vehículo.

- 20 Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas tales como el toxoide del tétanos, toxoide de pertussis, toxoide del cólera (por ejemplo, como se describe en solicitud de patente internacional WO2004/083251), LT de *E. coli*, ST de *E. coli* y la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También se pueden usar las proteínas de membrana externa bacteriana tales como el complejo c de la membrana externa (OMP), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína de superficie neumocócica (PspA), proteína adhesina neumocócica (PsaS), peptidasa C5a de estreptococos del Grupo A o del Grupo B, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. También se pueden usar como proteínas vehículo otras proteínas tales como la ovoalbúmina, la hemocianina de lapa californiana (KLH), la albúmina de suero bovino (BSA) o un derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD).

- 30 Tras la conjugación del polisacárido capsular con la proteína vehículo, los conjugados de polisacárido-proteína se purifican (es decir, se enriquecen con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante una variedad de técnicas. Estas técnicas incluyen las operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y filtración en profundidad.

- 35 Como se trata en más detalle a continuación, las composiciones inmunogénicas de la presente invención comprenden al menos un conservante útil para la producción de formulaciones vacunales multidosis que tienen propiedades ventajosas con respecto a la estabilidad a largo plazo de uno o más determinantes antigénicos de los conjugados de polisacárido capsular-proteína de neumococos multivalentes, y que protegen ventajosamente las composiciones de la contaminación, confiriendo resistencia a uno o más microorganismos antes de su administración a un sujeto que las necesita.

- 40 La formulación adicional de la composición inmunogénica que contiene conservante de la presente invención puede realizarse usando procedimientos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, los trece conjugados de neumococos individuales se pueden formular con un vehículo fisiológicamente aceptable para preparar la composición. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa, como se describe en más detalle a continuación.

- 45 Las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden uno o más conservantes, además de una pluralidad de conjugados de polisacárido capsular-proteína de neumococos. La FDA exige los productos biológicos en multidosis.

- 50 Los viales (multidosis) contienen un conservante, con solo unas cuantas excepciones. Los productos vacunales que contienen conservantes incluyen vacunas que contienen cloruro de bencetonio (ántrax), 2-fenoxietanol (DTaP, HepA, Lyme, Polio (parenteral)), fenol (neumo, tifoideo (parenteral), vaccinia) y Timerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, gripe, JE, Mening, neumo, rabia). Los conservantes aprobados para su uso en fármacos inyectables incluyen, por ejemplo, clorobutanol, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, 2-fenoxietanol, cloruro de bencetonio, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alcohol bencílico, fenol, Timerosal y nitrato fenilmercúrico.

- 55 Tras haber ensayado una variedad de posibles formulaciones adecuadas que comprenden un conservante para mejorar la eficacia y la estabilidad de las composiciones inmunogénicas de Prev(e)nar 13, la invención desvelada en el presente documento proporciona dichas composiciones inmunogénicas neumocócicas que comprenden 2-fenoxietanol (2-PE) a una concentración de aproximadamente 3,5-7,5 mg/dosis (0,7-1,5 %). En ciertas realizaciones, la concentración de 2-PE es de aproximadamente 5 mg/dosis (1 %). En ciertas realizaciones, la concentración de 2-

PE no es inferior a 3,5 mg/dosis (0,7 %), no es inferior a 4,0 mg/dosis (0,8 %), no es inferior a 4,5 mg/dosis (0,9 %), no es inferior a 5,0 mg/dosis (1 %), no es inferior a 5,5 mg/dosis (1,1 %), no es inferior a 6,0 mg/dosis (1,2 %), no es inferior a 6,5 mg/dosis (1,3 %), no es inferior a 7,0 mg/dosis o no es inferior a 7,5 mg/dosis (1,5 %).

5 En ciertas realizaciones de la invención, las composiciones inmunogénicas neumocócicas contienen uno o más conservantes adicionales, incluyendo, pero sin limitación, Timerosal y formalina.

10 En ciertas realizaciones, la composición inmunogénica puede comprender uno o más adyuvantes. Como se define en el presente documento, un "adyuvante" es una sustancia que sirve para potenciar la inmunogenicidad de una composición inmunogénica de la presente invención. Por lo tanto, se suelen administrar adyuvantes para aumentar la respuesta inmune, y son bien conocidos para el experto en la materia. Los adyuvantes adecuados para potenciar la eficacia de la composición incluyen, pero sin limitación:

(1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.;
 (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (definidos a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo,

15 (a) MF59 (solicitud PCT WO 90/14837), que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-EP (véase, a continuación, aunque no es necesario)) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA),

20 (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero de bloques de Pluronic L121 al 5 % y thr-MDP (véase a continuación) bien microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado con formación de vórtice para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor, y

25 (c) sistema de adyuvante Ribi (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes bacterianos de la pared celular del grupo que consiste en monofosforil-lípido A 3-O-desalado (MPL) descrito en la patente de EE.UU. n.º 4.912.094 (Corixa), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox);
 (d) Polisorbato 80 (Tween 80);

(3) se pueden usar adyuvantes de saponina tales como Quil A o STIMULON QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (patente de EE.UU. n.º 5.057.540) o las partículas generadas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes);

30 (4) lipopolisacáridos bacterianos, análogos de lípido A sintéticos tales como compuestos de fosfato de aminoalquilglucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que se encuentran disponibles en Corixa, y que se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.113.918; una de dichas AGP es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil-2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosido, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529), que está formulado como una forma acuosa o como una emulsión estable, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen motivo/s CpG (patente de EE.UU. n.º 6.207.646);

35 (5) citocinas tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), moléculas coestimulantes B7-1 y B7-2, etc.;

40 (6) mutantes desintoxicados de una toxina bacteriana de ribosilación de ADP, tal como una toxina del cólera (CT), bien en una forma de tipo silvestre o una forma mutante, por ejemplo, donde el ácido glutámico de la posición de aminoácido 29 está reemplazado por otro aminoácido, preferentemente una histidina, de conformidad con el número de solicitud de patente internacional publicada WO 00/18434 (véase también los documentos WO 02/098368 y WO 02/098369), una toxina *pertussis* (PT) o una toxina de *E. coli* lábil al calor (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129 (véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/13302 y WO 92/19265); y

45 (7) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición tales como sal de calcio, hierro, cinc, suspensión de tirosina acilada, azúca acilado, azúcares/sacáridos derivatizados, polifosfacenos, microesferas biodegradables, monofosforil lípido A (MPL), derivados de lípido A (por ejemplo, de toxicidad reducida), MPL 3-O-desalado, quil A, saponina, QS21, tocol, adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI), adyuvante Merck 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ), AS-2 (Smith-Kline Beecham, Filadelfia, PA), oligonucleótidos CpG (preferentemente, no metilados), bioadhesivos y mucoadhesivos, micropartículas, liposomas, formulaciones de éteres de polioxietileno, formulaciones de éteres de polioxietileno y péptidos de muramilo o compuestos de imidazoquinolona. Los péptidos de muramilo incluyen, pero sin limitación, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-EP), y similares.

50 En ciertas realizaciones, la composición adyuvante es aquella que favorece la inducción de citocinas de tipo TH1 (por ejemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-12) en un grado mayor que las citocinas de tipo TH2, que puede favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células a un antígeno administrado. Los sistemas adyuvantes

particulares que potencian una respuesta TH1 predominante incluyen, pero sin limitación, los derivados del lípido A tales como monofosforil lípido A (MPL) o sus derivados, por ejemplo, MPL 3-des-O-acilado (3D-MPL), una combinación de MPL y/o 3D-MPL y una sal de aluminio y/o un derivado de saponina (por ejemplo, QS21 en combinación con 3D-MPL según lo desvelado en el documento WO 94/00153, o QS21 y colesterol según lo desvelado en el documento WO 96/33739), triterpenoides y emulsiones de aceite en agua, tales como aquella que comprende tocoferol (según lo desvelado en el documento WO 95/17210).

Opcionalmente, un adyuvante se puede adsorber por o combinarse con uno o más de los componentes inmunogénicos de la formulación de vacuna conservada de la invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno adsorbido" se refiere a una mezcla en la que más del 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de un antígeno se adsorbe al adyuvante. En ciertas realizaciones, el adyuvante es fosfato de aluminio (Al³⁺) o hidroxifosfato de aluminio adsorbido. Por lo general, el contenido total de aluminio es de 200-1000 µg, 300-900 µg, 400-800 µg, 500-700 µg o aproximadamente 630 µg de Al³⁺ por dosis de 0,5 ml, que puede ser toda de hidróxido de aluminio o toda de fosfato de aluminio. Como alternativa, el contenido de Al³⁺ puede ser de una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio en diversas proporciones, por ejemplo, 1:8-8:1, 1:4-4:1, 3:8-8:3, 1:2-2:1 o 1:1 de fosfato de aluminio:hidróxido de aluminio. Aunque la mayor parte del aluminio es proporcionado por los antígenos preadsorbidos antes de que la mezcla forme una vacuna de combinación, se puede añadir parte del aluminio en forma libre durante la formulación de la vacuna de la combinación de la invención, por ejemplo, antes de la etapa de ajuste del pH descrita en el presente documento. Por lo general, el contenido de aluminio libre por dosis de 0,5 ml puede ser de 0-300 µg, 50-250 µg, 75-200 µg, 100-150 µg o de aproximadamente 120 µg de Al³⁺. El Al³⁺ libre puede ser todo de Al(OH)₃ o todo de AlPO₄, o una mezcla de Al(OH)₃ y AlPO₄ en diversas relaciones.

Los componentes antigénicos de la vacuna se pueden adsorber previamente sobre una sal de aluminio de forma individual antes de la mezcla. En otra realización, una mezcla de antígenos se puede adsorber previamente antes de la mezcla con otros adyuvantes. Como alternativa, se pueden formular ciertos componentes de las vacunas de la invención, pero no adsorberse intencionalmente sobre adyuvante.

Las formulaciones de la invención pueden comprender además uno o más de entre un tampón, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un crioprotector tal como un azúcar y un antioxidante tal como un neutralizante de radicales libres o un agente quelante, o cualquier combinación múltiple de los mismos. La elección de cualquier componente, por ejemplo, de un quelante, puede determinar si se desea o no otro componente (por ejemplo, un neutralizante). La composición final formulada para la administración debería ser estéril y/o exenta de pirógenos. El experto en la materia puede determinar empíricamente qué combinaciones de estos y otros componentes serán óptimas para su inclusión en las composiciones vacunales que contienen conservantes de la invención dependiendo de una variedad de factores tales como las condiciones de almacenamiento y de administración particulares necesarias.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tampones fisiológicamente aceptables seleccionados de, pero sin limitación, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato. En ciertas realizaciones, la formulación se tampona en un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, preferentemente de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,4.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable ajustar el pH de la composición inmunogénica o de la formulación de la invención. El pH de una formulación de la invención se puede ajustar usando técnicas convencionales en la materia. El pH de la formulación puede ajustarse para que sea de entre 3,0 y 8,0. En ciertas realizaciones, el pH de la formulación puede ser o puede ajustarse para que sea de entre 3,0 y 6,0, de 4,0 y 6,0 o de 5,0 y 8,0. En otras realizaciones, el pH de la formulación puede ser o puede ajustarse para que sea de aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5 o aproximadamente 8,0. En ciertas realizaciones, el pH puede ser o puede ajustarse para que esté en un intervalo de 4,5 a 7,5, o de 4,5 a 6,5, de 5,0 a 5,4, de 5,4 a 5,5, de 5,5 a 5,6, de 5,6 a 5,7, de 5,7 a 5,8, de 5,8 a 5,9, de 5,9 a 6,0, de 6,0 a 6,1, de 6,1 a 6,2, de 6,2 a 6,3, de 6,3 a 6,5, de 6,5 a 7,0, de 7,0 a 7,5 o de 7,5 a 8,0. En una realización específica, el pH de la formulación es de aproximadamente 5,8.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más cationes divalentes, incluyendo, pero sin limitación, MgCl₂, CaCl₂ y MnCl₂, a una concentración que varía de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, prefiriéndose hasta aproximadamente 5 mM.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende una o más sales, incluyendo, pero sin limitación, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio y sulfato de potasio, presentes a una fuerza iónica que es fisiológicamente aceptable para el sujeto tras la administración parenteral e incluidas a una concentración final para producir una fuerza iónica seleccionada u osmolaridad en la formulación final. La fuerza iónica final o la osmolaridad de la formulación estarán determinadas por múltiples componentes (por ejemplo, iones de compuesto/s de tamponamiento y otras sales no de tamponamiento). Una sal preferida, el NaCl, está presente de un intervalo de hasta aproximadamente 250 mM,

seleccionándose las concentraciones de sal para complementar otros componentes (por ejemplo, azúcares) de manera que la osmolalidad total final de la formulación sea compatible con la administración parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular o subcutánea) y potencie la estabilidad a largo plazo de los componentes inmunogénicos de la formulación de vacuna en varios intervalos de temperatura. Las formulaciones de sales libres tolerarán mayores intervalos de uno o más crioprotectores seleccionados para mantener los niveles de osmolaridad finales deseados.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más crioprotectores seleccionados de, pero sin limitación, disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa o trehalosa) e hidrocarburos polihidroxilados (por ejemplo, dulcitol, glicerol, manitol y sorbitol).

En ciertas realizaciones, la osmolaridad de la formulación está en un intervalo de aproximadamente 200 mOs/l a aproximadamente 800 mOs/l, con un intervalo preferido de aproximadamente 250 mOs/l a aproximadamente 500 mOs/l, o de aproximadamente 300 mOs/l - de aproximadamente 400 mOs/l. Una formulación exenta de sal puede contener, por ejemplo, del aproximadamente 5 % al aproximadamente 25 % de sacarosa, y preferentemente del aproximadamente 7 % al aproximadamente 15 %, o del aproximadamente 10 % al aproximadamente 12 % de sacarosa. Como alternativa, una formulación exenta de sal puede contener, por ejemplo, del aproximadamente 3 % al aproximadamente 12 % de sorbitol, y preferentemente del aproximadamente 4 % al 7 %, o del aproximadamente 5 % al aproximadamente 6 % de sorbitol. Si se añade sal, tal como cloruro de sodio, entonces, el intervalo eficaz de sacarosa o sorbitol se reduce relativamente. Estas y otras dichas consideraciones de osmolalidad y osmolaridad pertenecen al ámbito de la técnica.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más inhibidores de la oxidación de radicales libres y/o agentes quelantes. Se conoce una variedad de neutralizadores de radicales libres y quelantes en la materia y se aplican a las formulaciones y los procedimientos de uso descritos en el presente documento. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, etanol, EDTA, una combinación de EDTA/etanol, trietanolamina, manitol, histidina, glicerol, citrato de sodio, hexafosfato de inositol, tripolifosfato, ácido ascórbico/ascorbato, ácido succínico/succinato, ácido málico/maleato, desferal, EDDHA y DTPA, y diversas combinaciones de dos o más de los anteriores. En ciertas realizaciones, se puede añadir al menos un neutralizante de radicales libres no reductor a una concentración que potencie efectivamente la estabilidad a largo plazo de la formulación. También se pueden añadir uno o más inhibidores de la oxidación de radicales libres/quelantes en diversas combinaciones, tales como un neutralizante y un catión divalente. La elección del quelante determinará si se requiere o no la adición de un neutralizante.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tensioactivos no iónicos, incluyendo, pero sin limitación, ésteres de ácidos grasos de polioxitilensorbitán, polisorbato-80 (Tween 80), Polisorbato-60 (Tween 60), polisorbato-40 (Tween 40) y polisorbato-20 (Tween 20), alquiléteres de polioxitileno, incluyendo, pero sin limitación, Brij 58, Brij 35, así como otros tales como Triton X-100; Triton X-114, NP40, Span 85 y la serie Pluronic de tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Pluronic 121), con componentes preferidos de Polisorbato-80 a una concentración del aproximadamente 0,001 % al aproximadamente 2 % (prefiriéndose hasta aproximadamente 0,25 %) o Polisorbato-40 a una concentración del aproximadamente 0,001 % al 1 % (prefiriéndose hasta aproximadamente 0,5 %).

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención comprende uno o más agentes estabilizantes adicionales adecuados para la administración parenteral, por ejemplo, un agente reductor que comprende al menos un grupo tiol (-SH) (por ejemplo, cisteína, *N*-acetil-cisteína, glutatión reducido, tioglicolato de sodio, tiosulfato, monotioglicerol o mezclas de los mismos). Como alternativa u opcionalmente, las formulaciones vacunales que contienen conservantes de la invención se pueden estabilizar aún más mediante la eliminación del oxígeno de los recipientes de almacenamiento, protegiendo la formulación de la luz (por ejemplo, mediante el uso de envases de vidrio ámbar).

Las formulaciones vacunales que contienen conservantes de la invención pueden comprender uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, que incluyen cualquier excipiente que no induzca por sí mismo una respuesta inmune. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, macromoléculas tales como proteínas, sacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa (Paoletti y col, 2001, *Vaccine*, 19:2118), trehalosa, lactosa y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Dichos vehículos son bien conocidos para el experto en la materia. Se describen excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, en Gennaro, 2000, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición, ISBN:0683306472.

Las composiciones de la invención pueden estar liofilizadas o en forma acuosa, es decir, soluciones o suspensiones. Las formulaciones líquidas se pueden administrar ventajosamente directamente desde su forma envasada y ser, por lo tanto, ideales para la inyección sin la necesidad de su reconstitución en un medio acuoso como, de otro modo, se requiere para las composiciones liofilizadas de la invención.

En la presente invención, la vacuna es una composición inmunogénica multivalente que comprende polisacáridos capsulares de neumococos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, conjugados individualmente a CRM₁₉₇. La vacuna se puede formular para que comprenda: de 1 a 5 µg, preferentemente aproximadamente 4,4 µg/ml de cada polisacárido, pero preferentemente aproximadamente 8,8 µg/ml de 6B; de 20 a

100 µg/ml, preferentemente aproximadamente 58 µg/ml de proteína vehículo CRM₁₉₇; de 0,02 a 2 mg/ml, preferentemente 0,25 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio; cloruro sódico del 0,5 al 1,25 %, preferentemente aproximadamente al 0,85 %; polisorbato 80 del 0,002 al 0,2 %, preferentemente al aproximadamente 0,02 %; tampón de succinato sódico 1 a 10 mM, preferentemente aproximadamente 5 mM a un pH de 4 a 7, preferentemente a un pH de 5,8; y de 4 a 20 mg/ml, preferentemente aproximadamente 10 mg/ml de 2-fenoxietanol.

En presente invención, la vacuna es una composición inmunogénica multivalente que comprende polisacáridos capsulares de neumococos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, conjugados individualmente a CRM₁₉₇. La vacuna se puede formular para que comprenda: aproximadamente 4,4 µg/ml de cada polisacárido, a excepción de 6B a aproximadamente 8,8 µg/ml; aproximadamente 58 µg/ml de proteína vehículo CRM₁₉₇; aproximadamente 0,25 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio; cloruro de sodio al aproximadamente 0,85 %; polisorbato 80 al aproximadamente 0,02 %; tampón de succinato sódico aproximadamente 5 mM a un pH de 5,8; y aproximadamente 10 mg/ml de 2-fenoxietanol.

La cantidad de muchos de los materiales que puede comprender la composición de la invención se puede expresar en peso/dosis, en peso/volumen, o % de concentración (en peso/volumen o peso/peso). Todos estos valores se pueden convertir entre sí. Para las conversiones en y a partir de una unidad de peso/dosis, se especifica un volumen de la dosis. Por ejemplo, dada una dosis de 0,5 ml, 5,0 mg/dosis de 2-PE es equivalente a una concentración de 10 mg/ml o 1,0 % (g/100 ml).

La formulación de la vacuna también se puede expresar como una proporción de polisacárido:2-PE. Por ejemplo, una dosis de 0,5 ml de la formulación preferida de 4,4 µg/ml de cada sacárido, a excepción de 6B a 8,8 µg/ml y de 10 mg/ml de 2-PE tendrá 30,8 µg de polisacárido (2,2 µg x 12 serotipos + 4,4 µg para el serotipo 6B) y 5.000 µg de 2-PE. Por lo tanto, la proporción en peso de polisacárido:2-PE es de 30,8:5.000.

En ciertas realizaciones de la invención, la proporción en peso de polisacárido:2-PE de la vacuna es de 5:5.000 a 100:5.000. En una realización preferida de la invención, dicha proporción en peso de polisacárido:2-PE es de aproximadamente 30,8:5.000.

Administración de formulaciones vacunales

También se proporcionan procedimientos de uso de las composiciones y formulaciones farmacéuticas desveladas que comprenden al menos un conservante para inducir una respuesta inmune contra un neumococo en un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano, preferentemente en un niño o un bebé, y para protegerlo de este modo contra la infección. Las formulaciones vacunales de la presente invención se pueden usar para proteger a un sujeto humano susceptible a la infección neumocócica, mediante la administración de la vacuna a través de una vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir, por ejemplo, la administración parenteral o la administración mucosa por la vía oral/alimentaria, respiratoria o genitourinaria.

La administración directa de los preparados vacunales de la presente invención a un sujeto se puede realizar mediante la administración parenteral (intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa o al espacio intersticial de un tejido); mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración mucosa. En una realización preferida, la administración parenteral es por inyección intramuscular, por ejemplo, en el muslo o parte superior del brazo del sujeto. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero, como alternativa, se puede usar una inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml. Las composiciones de la invención pueden prepararse en diversas formas, por ejemplo, para la inyección bien como soluciones o suspensiones líquidas. En ciertas realizaciones, la composición se puede preparar como un polvo o pulverizado para la administración pulmonar, por ejemplo, en un inhalador. En otras realizaciones, la composición se puede preparar como un supositorio o pesario, o para la administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, en forma de un pulverizado, gotas, gel o polvo.

En una realización, se puede usar la administración intranasal para la prevención de la neumonía o la otitis media (pues se puede prevenir de manera más eficaz el porte nasofaríngeo de neumococos, atenuándose así la infección en su etapa más temprana).

La cantidad de conjugado de cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos significativos. Dicha cantidad puede variar dependiendo del serotipo del neumococo. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de polisacárido, particularmente de 0,1 a 10 µg, y más particularmente de 1 a 5 µg.

Las cantidades óptimas de componentes para una determinada vacuna se pueden determinar mediante estudios convencionales que impliquen la observación de respuestas inmunes apropiadas en sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas.

La pauta periódicas para bebés y niños pequeños contra la enfermedad invasiva causada por *S. pneumoniae* debido a los serotipos incluidos en la vacuna Prev(e)nar 13 es de 2, 4, 6 y 12-15 meses de edad. Las composiciones de la

presente invención también son adecuadas para su uso con los niños mayores, adolescentes, jóvenes y adultos en los que se puedan aplicar las mismas o diferentes pautas periódicas, según lo determinado por el profesional experto.

Envasado y formas de dosificación

5 Las vacunas de la invención pueden envasarse en formas de monodosis o de multidosis (por ejemplo, 2 dosis, 4 dosis o más). Para las formas multidosis, normalmente, pero no necesariamente, se prefieren los viales a las jeringas precargadas. Las formas multidosis adecuadas incluyen, pero sin limitación: de 2 a 10 dosis por envase a 0,1 a 2 ml por dosis. En ciertas realizaciones, la dosis es una dosis de 0,5 ml. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO2007/127668. Las composiciones pueden presentarse en viales u otros recipientes de almacenamiento adecuados, o pueden presentarse en dispositivos de administración precargados, por ejemplo, jeringas de un solo componente o múltiples componentes, que pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa normalmente, pero no necesariamente, contiene una sola dosis de la composición vacunal que contiene conservante de la invención, aunque también se prevén las jeringas precargadas multidosis. Del mismo modo, un vial puede incluir una sola dosis, pero, como alternativa, puede incluir múltiples dosis.

15 Los volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse periódicamente, pero una dosis típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml. En ciertas realizaciones, la dosis se formula para la administración a un sujeto humano. En ciertas realizaciones, la dosis se formula para la administración a un sujeto humano adulto, joven, adolescente, niño o bebé (es decir, de no más de un año de edad) y, en realizaciones preferidas, se puede administrar por inyección.

20 Las vacunas líquidas de la invención también son adecuadas para la reconstitución de otras vacunas que se presentan en forma liofilizada. Cuando una vacuna se va a usar para dicha reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit con dos o más viales, dos o más jeringas cargadas preparadas, o uno o más de cada uno, usándose el contenido de la jeringa para reconstituir el contenido del vial antes de la inyección, o viceversa.

25 Como alternativa, las composiciones vacunales de la presente invención pueden estar liofilizadas y reconstituirse, por ejemplo, usando uno de una multitud de procedimientos para la liofilización bien conocida en la materia para formar partículas secas, de forma regular (por ejemplo, esférica), tales como microgránulos o microesferas, que tienen características de las partículas tales como tamaños de diámetro medio que se pueden seleccionar y controlar mediante la variación de los procedimientos exactos usados para prepararlas. Las composiciones vacunales pueden comprender además un adyuvante que se puede preparar opcionalmente con o contenerse en partículas secas, de forma regular (por ejemplo, esféricas) por separado tales como microgránulos o microesferas. En dichas realizaciones, la presente invención proporciona además un kit de vacunación que comprende un primer componente que incluye una composición vacunal seca, estabilizada, que comprende además opcionalmente uno o más conservantes de la invención, y un segundo componente que comprende una solución acuosa, estéril, para la reconstitución del primer componente. En ciertas realizaciones, la solución acuosa comprende uno o más conservantes, y puede comprender opcionalmente al menos un adyuvante (véase, por ejemplo, el documento WO2009/109550).

35 En otra realización más, un recipiente del formato multidosis se selecciona de uno o más del grupo que consiste en, pero sin limitación, cristalería general de laboratorio, matraces, vasos de precipitados, probetas graduadas, fermentadores, biorreactores, tuberías, tubos, bolsas, frascos, viales, cierres de viales (por ejemplo, un tapón de caucho, una tapa a rosca), ampollas, jeringas, jeringas de dos o múltiples cámaras, tapones de jeringas, émbolos de jeringa, cierres de caucho, cierres de plástico, cierres de vidrio, cartuchos y jeringas desechables y similares. El recipiente de la presente invención no está limitado por el material de fabricación, e incluye materiales tales como vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, elastómeros termoplásticos). En una realización particular, el recipiente del formato es un vial de vidrio de 5 ml Schott de Tipo 1 con un tapón de butilo. El experto en la materia apreciará que el formato que se ha expuesto anteriormente no es de ninguna manera una lista exhaustiva, sino que simplemente sirve como guía para el técnico con respecto a la variedad de formatos disponibles para la presente invención. Los formatos adicionales contemplados para su uso en la presente invención pueden encontrarse en los catálogos publicados de los proveedores de equipos de laboratorio y los fabricantes tales como United Status Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

50 Procedimientos de evaluación de la eficacia de los conservantes en las composiciones vacunales

La presente divulgación proporciona además nuevos procedimientos de medición de la eficacia de una formulación de vacuna que comprende uno o más agentes conservantes seleccionados en presencia de algunos de o todos los componentes inmunogénicos o no inmunogénicos de la composición vacunal. El protocolo de la OMS sobre la eficacia de los conservantes utiliza ensayos USP y EP, e incluye las condiciones de la política de viales abiertos al realizar ciertos ensayos. Un ensayo típico de la eficacia de la conservación es un ensayo de una sola exposición en el que se inocula una composición de ensayo una vez con una población de microorganismos seleccionada, y se compara la reducción logarítmica del microorganismo inoculado a lo largo del tiempo y en condiciones ambientales particulares (por ejemplo, temperatura) con la reducción logarítmica del microorganismo inoculado en una composición de control que carece del/de los conservante/s de ensayo. Véanse, por ejemplo, los siguientes

Ejemplos 2 y 3. Sin embargo, no se han requerido ensayos adicionales para abordar la eficacia de los conservantes tras múltiples contaminaciones, por ejemplo, para abordar los viales y los tapones mediante la inoculación de los mismos viales múltiples veces.

5 Por consiguiente, la divulgación proporciona un ensayo de múltiples exposiciones para evaluar la eficacia de uno o más conservantes en una composición inmunogénica, en la que el ensayo comprende al menos dos etapas de inoculación de la composición de ensayo con una población de microorganismos seleccionada y la comparación de la reducción del/de los microorganismo/s inoculado/s en el tiempo y en determinadas condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura) con la reducción en una composición de control que carece del/de los conservante/s de ensayo. Véanse los Ejemplos 4 y 5 que figuran más adelante.

10 **Eficacia de los conservantes**

Las formulaciones vacunales que contienen conservantes de la presente invención son adecuadas para llenar un vial o recipiente multidosis de vacuna compatible con, por ejemplo, la administración parenteral, y mantenerlas estables durante largos períodos de tiempo a 2-8 °C, a temperatura ambiente o a 37 °C con una pérdida reducida o insignificante de la actividad en comparación con la misma formulación sin conservante/s.

15 La cantidad de conservante de la formulación se selecciona para que sea una cantidad que cumpla los requisitos de seguridad de las vacunas, definidos por las farmacopeas de Estados Unidos (EE.UU.), europea o de la Organización Mundial de la Salud (OMS), o una combinación de las mismas.

20 Para la determinación de los niveles de conservantes de acuerdo con las Farmacopeas estadounidense y europea (USP y EP, respectivamente), la formación de la vacuna se inocula una vez con de aproximadamente 10^5 a 10^6 UFC/ml en el punto temporal 0 (UFC = unidades formadoras de colonias) de:

1. *Staphylococcus aureus* (bacterias; ATCC n.º 6538; "SA")
2. *Pseudomonas aeruginosa* (bacterias; ATCC n.º 9027; "PA")
3. *Candida albicans* (levadura; ATCC n.º 10231; "CA")
4. *Aspergillus niger* (moho; ATCC n.º 16404; "AN").

25 Para representar el peor caso razonable de contaminación que pueda producirse en la práctica durante el uso repetido de una presentación multidosis, la OMS requiere ensayos de seguridad con la exposición deliberada a múltiples contaminaciones usando cepas de bacterias de *Pseudomonas aeruginosa* ("PA"), *Staphylococcus aureus* ("SA"), *Escherichia coli* ("CE") y *Bacillus subtilis* ("BA"). Se añaden a las formulaciones 5×10^3 UFC/ml de cada organismo en los puntos temporales 0, 6 horas, 24 horas, 7 días y 14 días después de la exposición inicial y se almacenan, bien a 2-8 °C o a 22-24 °C para imitar las posibles condiciones de almacenamiento en la práctica.

30 USP 29 NF 24 Suplemento 2 (USP) requiere que, tras una inoculación de microorganismo/s bacteriano/s, haya una reducción logarítmica de al menos 1,0 con respecto al recuento inicial calculado (es decir, en el momento de la inoculación) a los 7 días, una reducción logarítmica de al menos 3,0 a los 14 días con respecto al valor anterior medido, y ningún aumento a los 28 días en comparación con el valor anterior medido. Véase la **Tabla 1**. Para las levaduras y los hongos, el requisito de la USP es que no haya ningún aumento desde el momento de la inoculación a los 7, 14 y 28 días.

35 Los requisitos de la EP son más estrictos. Los requisitos de EP 5ª Edición 5.6 (5.1.3) para los preparados parenterales y oftálmicos tienen dos componentes: la Categoría A y la Categoría B. La Categoría A (EP-A) requiere, para las bacterias, una reducción logarítmica de al menos 2,0 con respecto al recuento inicial calculado a las 6 horas de la inoculación, una reducción logarítmica de al menos 3,0 con respecto al valor anterior medido a las 24 horas y sin recuperación alguna a los 28 días. La Categoría B (EP-B) requiere, para las bacterias, una reducción logarítmica de al menos 1,0 con respecto al recuento inicial calculado a las 24 horas, una reducción logarítmica de al menos 3,0 a los 7 días con respecto al valor medido anterior y un aumento logarítmico no superior a 0,5 con respecto al valor medido anterior (es decir, sin aumento) a los 28 días. Véase la **Tabla 1**. Para las levaduras y los hongos, la Categoría A requiere una reducción logarítmica de al menos 2,0 a los 7 días del recuento calculado inicial, y ningún aumento a los 28 días con respecto al valor medido anterior; y la Categoría B requiere una reducción logarítmica de al menos 1,0 con respecto al recuento calculado inicial a los 14 días y ningún aumento a los 28 días con respecto al valor medido anterior.

50 **Tabla 1: Criterios de aceptación para el ensayo de la eficacia de los conservantes entre las Farmacopeas estadounidenses, europea y japonesa**

Organismos	Procedimiento	Reducción logarítmica de UFC/ml				
		6 h	24 h	7 d	14 d	28 d
Bacterias	EP A*	2	3	-	-	NR***
	EP B	-	1	3	-	NA**
	USP	-	-	1	3	NA

(Continuación)

Organismos	Procedimiento	Reducción logarítmica de UFC/ml				
		6 h	24 h	7 d	14 d	28 d
Levadura y hongos	JP	-	-	-	3	NA
	EPA	-	-	2	-	NA
	EP B	-	-	-	1	NA
	USP	-	-	NA	NA	NA
	JP	-	-	-	NA	NA

*Los criterios A expresan la eficacia recomendada que se debe alcanzar. En casos justificados, cuando los criterios A no se pueden alcanzar, se deben cumplir los criterios B.

**NA: Ningún aumento: se define como no más de 0,5 Log₁₀ superior al valor anterior medido.

*** NR: Ninguna recuperación.

5 En ciertas realizaciones de la presente invención, un conservante de la invención es eficaz en la reducción de la concentración de microorganismos en la formulación inmunogénica. En ciertas realizaciones de la invención, la formulación de vacuna, que comprende al menos un conservante, reduce la concentración de uno o más microorganismos tras la inoculación con dichos microorganismos en comparación con la formulación de vacuna sin el uno o más conservantes. En una realización particular de la invención, la formulación presenta una reducción logarítmica de al menos 1,0 con respecto al recuento inicial de microorganismos a las 24 horas, una reducción logarítmica de al menos 3,0 a los 7 días con respecto al valor anterior medido y un aumento logarítmico no superior a 0,5 a los 28 días con respecto al valor medido anterior. En otra realización particular de la invención, la formulación presenta una reducción logarítmica de al menos 2,0 con respecto al recuento inicial calculado a las 6 horas de la inoculación, una reducción logarítmica de al menos 3,0 a las 24 horas con respecto al valor anterior medido y ninguna recuperación a los 28 días, en comparación de el recuento inicial de microorganismos. En otra realización de la invención, la formulación cumple los requisitos de la Farmacopea europea (EP) para los preparados parenterales y oftálmicos, en particular, la Categoría A (EP-A) y/o la Categoría B (EP-B) de requisitos de la EP 5ª edición 5.6 (5.1.3). En otra realización de la invención, la formulación cumple con los requisitos de la Farmacopea estadounidense (USP) 29 NF 24 Suplemento 2 para los preparados parenterales.

20 En ciertas realizaciones de la invención, el al menos un conservante de la invención es eficaz en la reducción de la concentración de microorganismos en la formulación cuando se expone a microorganismos en comparación con una formulación que carece de los uno o más conservantes. Los microorganismos pueden ser, sin limitación, uno o más de los siguientes: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y otros.

25 En ciertas realizaciones de la invención, los microorganismos se pueden introducir o inocular en la vacuna una o más veces en diversos intervalos. La inoculación puede producirse en el contexto de una inoculación experimental deliberada o en el contexto de una aguja hipodérmica contaminada que se introduce en un recipiente de una formulación de vacuna multidosis. El intervalo entre las inoculaciones puede estar entre 1 minuto y 1 mes. En una realización particular, las múltiples inoculaciones se producen, tras una inoculación inicial, a las 6 horas de la inoculación inicial, a las 24 horas de la inoculación inicial, a los 7 días de la inoculación inicial y a los 14 días de la inoculación inicial.

30 **Parámetros para la estabilidad de las vacunas y de los conservantes**

35 En ciertas realizaciones de la presente invención, la antigenicidad de al menos un determinante antigénico (es decir, preparado de polisacáridos de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae*) en la formulación de vacuna es estable durante un intervalo de tiempos y temperaturas de almacenamiento. La antigenicidad se puede medir mediante procedimientos conocidos en la materia. Por ejemplo, la antigenicidad total se puede determinar mediante el uso de antisueros de tipo específico, tales como los descritos en el Ejemplo 3.

40 En ciertas realizaciones de la presente invención, la antigenicidad de al menos un determinante antigénico en la formulación de vacuna es estable durante no menos de 4 semanas, no menos de 6 semanas, no menos de 8 semanas, no menos de 10 semanas, no menos de 12 semanas, no menos de 18 semanas, no menos de 24 semanas, no menos de 48 semanas, no menos de 1 año, no menos de 1,25 años, no menos de 1,5 años, no menos de 1,75 años, no menos de 2 años, no menos de 2,25 años o no menos de 2,5 años. Preferentemente, la antigenicidad de una pluralidad de los determinantes antigénicos, por ejemplo, del al menos 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más, de los determinantes antigénicos de la vacuna en la formulación son estables durante no menos de 4 semanas, no menos de 6 semanas, no menos de 8 semanas, no menos de 10 semanas, no menos de 12 semanas, no menos de 18 semanas, no menos de 24 semanas, no menos de 48 semanas, no menos de 1 año, no menos de 1,25 años, no menos de 1,5 años, no menos de 1,75 años, no menos de 2 años, no menos de 2,25 años o no menos de 2,5 años.

En ciertas realizaciones de la presente invención, la antigenicidad de al menos un determinante antigénico en la formulación de vacuna es estable cuando se almacena de aproximadamente -25 °C a aproximadamente 37 °C, o de -20 a -10 °C, o de 2 a 8 °C, o aproximadamente la temperatura ambiente, o de 22 °C a 28 °C, o aproximadamente 37 °C. En una realización particular de la invención, la antigenicidad de al menos un determinante antigénico en la formulación de vacuna es estable tras el almacenamiento durante no menos de 2,5 años a una temperatura de 2-8 °C.

En ciertas realizaciones de la presente invención, la concentración del conservante de la invención se establece tras el almacenamiento de la vacuna en las duraciones y las temperaturas de almacenamiento mencionadas anteriormente. En una realización particular de la invención, la concentración del conservante en la formulación de vacuna es estable tras el almacenamiento de la vacuna durante no menos de 2,5 años a una temperatura de 2-8 °C. La concentración del conservante se puede medir mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el Timerosal se puede medir usando espectrometría de absorción atómica de vapor en frío (CVAAS), como se describe en el Ejemplo 3. La concentración 2-PE se puede medir con un ensayo de HPLC de fase inversa, también como se describe en el Ejemplo 3. Un ensayo de HPLC de fase inversa se puede realizar de la siguiente manera: Se agitan con formación de vórtice las muestras, y se diluyen a 1:10 en tampón de succinato 5 mM en solución salina, se centrifugan y se diluyen de nuevo a 1:10 en tampón de succinato 5 mM en solución salina (la dilución final de la muestra de ensayo es de 1:100). A continuación, se ensaya la muestra utilizando la columna de HPLC Agilent Eclipse XDB-C18 y un gradiente lineal de agua y acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético. Luego se compara la cuantificación del conservante con una curva patrón. Véase también Sharma y col., *Biologicals* 36(1): 61-63 (2008).

La divulgación anterior describe la presente invención en general. Se puede obtener una comprensión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Estudio preliminar de selección de conservantes

El desarrollo de la formulación de vacuna Prev(e)nar 13 multidosis comenzó con la selección preliminar de los conservantes, que incluían fenol (0,25 %), 2-fenoxietanol (5 mg/ml), Meta-cresol (0,3 %), metilparabeno y propilparabeno (0,18 % y 0,12 %, respectivamente) en formulaciones Prev(e)nar 13.

Para ensayar la eficacia de los conservantes, se inocularon alícuotas de la vacuna con los siguientes organismos:

1. *Staphylococcus aureus* (bacterias; ATCC n.º 6538)
2. *Pseudomonas aeruginosa* (bacteria ATCC n.º 9027)
3. *Candida albicans* (levadura; ATCC n.º 10231)
4. *Aspergillus niger* (moho; ATCC n.º 16404).

Se inocularon treinta mililitros (ml) de cada formulación de vacuna con y sin Timerosal o 2-PE a las concentraciones indicadas o solución salina que contenía Timerosal al 0,02 % por triplicado con una suspensión de cada organismo de ensayo para lograr una densidad de inóculo de aproximadamente 10^5 para 10^6 UFC/ml en el punto temporal 0 (UFC = unidades formadoras de colonias). El volumen de cada inóculo no superó el 1 % del volumen del producto durante cada exposición deliberada. Se mezclaron las muestras para garantizar una distribución uniforme de los organismos expuestos. Se usaron otros 30 ml de la vacuna por triplicado (con y sin conservante) como control negativo y se añadieron al medio de cultivo solo para evaluar la contaminación inherente que pudiera estar presente en la muestra o en los medios. Se incubó luego, por separado, cada una de las tres series de vacunas, y controles positivos y negativos, a una temperatura de 20 a 25 °C. Se enumeraron las alícuotas (1 ml) de las muestras y de los controles (o sus diluciones en serie con factor de dilución de diez) expuestos mediante el recuento en placa por duplicado en el punto temporal 0 y a intervalos de 6 horas, 24 horas, 7 días, 14 días y 28 días después de la inoculación.

USP 29 NF 24 Suplemento 2 (USP) requiere que, tras una inoculación de microorganismo/s bacteriano/s, haya una reducción logarítmica de al menos 1,0 con respecto al recuento calculado inicial (es decir, en el momento de la inoculación) a los 7 días, una reducción logarítmica de al menos 3,0 a los 14 días con respecto al valor medido anterior y ningún aumento a los 28 días con respecto al valor medido anterior. Véase la **Tabla 1**. Para las levaduras y los hongos, el requisito de la USP es que no haya ningún aumento desde el momento de la inoculación hasta los 7, 14 y 28 días.

Los requisitos de la EP son más estrictos. Los requisitos de EP 5ª Edición 5.6 (5.1.3) para los preparados parenterales y oftálmicos tienen dos componentes: la Categoría A y la Categoría B. La Categoría A (EP-A) requiere, para las bacterias, una reducción logarítmica de al menos 2,0 con respecto al recuento inicial calculado a las 6 horas de la inoculación, una reducción logarítmica de al menos 3,0 con respecto al valor anterior medido a las 24 horas y sin recuperación alguna a los 28 días. La Categoría B (EP-B) requiere, para las bacterias, una reducción logarítmica de al menos 1,0 con respecto al recuento inicial calculado a las 24 horas, una reducción logarítmica de al menos 3,0 a los 7 días con respecto al valor medido anterior y un aumento logarítmico no superior a 0,5 con respecto al valor

medido anterior (es decir, sin aumento) a los 28 días. Véase la **Tabla 1**. Para las levaduras y los hongos, la Categoría A requiere una reducción logarítmica de al menos 2,0 a los 7 días, y ningún aumento a los 28 días con respecto al valor medido anterior; y la Categoría B requiere una reducción logarítmica de al menos 1,0 a los 14 días y ningún aumento a los 28 días con respecto al valor medido anterior.

5 Durante la enumeración, se usaron placas que contenían < 300 UFC para las bacterias o < 100 UFC para la levadura o el moho. Para los estudios de una sola exposición, se midió el recuento medio aritmético de todos los microorganismos supervivientes por triplicado y en las placas por duplicado (6 valores por punto temporal), además de sus muestras diluidas y se normalizaron como UFC/ml. Los resultados se expresan como el log₁₀ de la reducción de las UFC/ml (en comparación con el punto temporal 0). En este caso, se evalúa el recuento de microorganismos supervivientes en el punto temporal 0 como el valor de referencia y se compara con el tiempo de incubación de 6 horas, 24 horas, 7 días, 14 días y 28 días.

15 Los conservantes ensayados no mostraron ningún impacto evidente en la estabilidad de Prev(e)nar 13 a excepción de los parabenos (metilparabeno y propilparabeno), que mostraron una reducción de la antigenicidad asociada a Prev(e)nar 13. Además, el fenol, el metacresol, los metil- y propil-parabenos interfirieron en el ensayo de proteínas de Lowry modificado (la concentración de proteína de la vacuna se determina mediante el ensayo de proteínas de Lowry modificado disponible en el mercado).

20 Los resultados del ensayo de la eficacia de los conservantes (PET) mostraron que todos los conservantes ensayados cumplieron los requisitos de la USP, pero no los criterios de la EP (EP-A o EP-B). Véase la **Tabla 2**. 2-PE fue el único conservante candidato que resultó ser seguro a las dosis más altas. Por lo tanto, se siguieron realizando más ensayos sobre la eficacia de los conservantes, con dosis más altas de 2-PE.

Tabla 2: Eficacia de los posibles conservantes en el cumplimiento de los requisitos de seguridad de las vacunas de la USP y EP* tras una sola exposición a los microorganismos

Dosis de 0,5 ml	Organismos de la exposición				
	Bacterias			Levadura	Hongos
	<i>S aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
2-Fenoxietanol a 5,0 mg/ml					
USP	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos
EP	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos
m-cresol al 0,3 %					
USP	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos
EP	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos
Metilparabenos al 0,18 % y propilparabenos al 0,02 %					
USP	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos
EP	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos
Fenol al 0,25 %					
USP	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos
EP	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios cumplidos	Criterios cumplidos
*EP-B					

25 **Ejemplo 2 - Ensayo de eficacia de los conservantes mediante un procedimiento de una sola exposición: 2-PE y Timerosal**

30 El Timerosal a una concentración del 0,01 % se usa comúnmente en las principales vacunas autorizadas en EE.UU. Se ensayó la eficacia del Timerosal como conservante usando el mismo procedimiento de una sola exposición descrito anteriormente en el Ejemplo 1. La formulación de vacuna Prev(e)nar 13, que contiene Timerosal al 0,01 % (equivalente a 25 µg de mercurio por 0,5 ml de dosis), no cumplió el criterio de aceptación europeo EP-A o EP-B establecido por el procedimiento de la eficacia antimicrobiana de los conservantes de la EP. Sin embargo, sí cumplió

los límites de aceptación establecidos por la Farmacopea de EE.UU. o japonesa, ya que los límites de aceptación establecidos por estos procedimientos reunidos son menos estrictos que lo establecido en la EP. Véase la **Figura 1**.

5 El Timerosal al 0,02 % (que contiene 50 µg de mercurio por dosis), que equivale al doble de la concentración recomendada de Timerosal en algunas de las vacunas autorizadas de Estados Unidos, o al 0,04 % (que contiene 100 µg de mercurio por dosis), que equivale a cuatro veces la concentración recomendada de Timerosal en algunas vacunas autorizadas de Estados Unidos, cumplió el criterio de aceptación B de la EP, pero no los criterios de aceptación A más estrictos (con una sola exposición de microorganismos). Véase la **Figura 1**.

10 2-PE fue más eficaz como conservante que el Timerosal. Mientras que 2-PE a 2,5 mg/dosis no cumplió los criterios de aceptación A y B de la EP, 2-PE a concentraciones de 3,5 a 5,5 mg/dosis cumplió los criterios de aceptación B de la EP. A concentraciones superiores a 6,0 mg/dosis, 2-PE cumplió ambos criterios de aceptación de eficacia antimicrobiana EP-A y EP-B (**Figura 2**).

Ejemplo 3 - Procedimiento de una sola exposición con 2-PE y Timerosal: Cambio en el nivel de contaminantes

15 La ausencia de conservantes en la formulación de vacuna Prev(e)nar 13 dio lugar a un lento crecimiento de *P. aeruginosa*, ningún cambio en los niveles de *C. albicans* y *A. Niger*, y una reducción lenta de unidades formadoras de colonias de *S. aureus* durante un período de exposición de 28 días a 20-25 °C (**Figura 3**).

20 La presencia de Timerosal al 0,01 % (que contiene 25 µg de mercurio por dosis) redujo los niveles de contaminación de los cuatro microorganismos inoculados. Sin embargo, la inhibición de *S. aureus* y *C. albicans* fue más débil que la inhibición de *P. aeruginosa* y *A. niger* (**Figura 4**). Se observó una relación de respuesta a la dosis en la velocidad del efecto antimicrobiano del Timerosal en las formulaciones vacunales Prev(e)nar 13, especialmente frente a *C. albicans*, siendo la reducción de los niveles de contaminación más pronunciados con el Timerosal al 0,02 % (**Figura 5**). La ausencia de Prev(e)nar 13 en una formulación de solución salina que contenía Timerosal al 0,02 % mejoró ligeramente la eficacia inhibitoria del crecimiento del Timerosal contra *S. aureus* y *C. albicans* (**Figura 6**).

25 El 2-PE fue más eficaz como conservante que el Timerosal. Por ejemplo, en contraste con la lenta disminución de *S. aureus* con el Timerosal, la eficacia antimicrobiana de 2-PE a 5,0 mg/dosis generó una reducción de *S. aureus* con respecto al valor inicial a las 24 horas de la inoculación (**Figura 7**). Aunque el 2-PE fue menos eficaz que el Timerosal como conservante contra *A. niger* (**Figura 7**), y la velocidad de reducción de la contaminación por *A. niger* fue más lenta en comparación con el Timerosal (**Figuras 4 y 5**), la eficacia superior del 2-PE con respecto a las otras cepas permitió cumplir los criterios de aceptación EP-B de los conservantes a una concentración de 3,5 y 5 mg/dosis (**Figura 2**), mientras que el Timerosal al 0,01 % no lo hizo (**Figura 1**).

30 La eficacia de conservación del 2-PE a una concentración de 3,5 a 5,0 mg/dosis perduró cuando las formulaciones se almacenaron a 37 °C durante un mes o a 2-8 °C durante dos años y medio (**Figura 2**). La concentración de 2-PE en la formulación fue igualmente estable (**Figura 15**). La actividad inmunológica (antigenicidad total) de cada uno de los 13 serotipos presentes en la formulación de Prev(e)nar 13 también se mantuvo estable en estas condiciones de almacenamiento (**Figura 14**).

35 Se derivó la antigenicidad total tanto de los polisacáridos unidos como de los no unidos presentes en la vacuna para cada serotipo. Se determinaron las antigenicidades específicas del tipo mediante el uso de antisueros específicos del tipo. Antes del ensayo, primero se disolvió la vacuna 13-valente formulada con fosfato de aluminio. Después, se neutralizó la solución para evitar la degradación inducida por las condiciones alcalinas. Usando un nefelómetro, el ensayo midió la velocidad de cambio de la intensidad de dispersión de la luz derivada de la formación de complejos de anticuerpo-antígeno. Las antigenicidades de las muestras de ensayo se determinaron por regresión lineal usando las curvas patrón medidas inmediatamente antes o después del análisis de las muestras.

40 Para garantizar el contenido de Timerosal de las formulaciones vacunales Prev(e)nar 13 y de solución salina, se determinó la concentración de mercurio en algunas de las formulaciones mediante el procedimiento de espectrometría de absorción atómica de vapor en frío (CVAAS). La concentración medida de mercurio estaba muy próxima a sus valores predichos, lo que sugiere que la concentración de Timerosal en estas formulaciones era diana y no se subestimó. La concentración medida de 2-PE también estaba muy próxima a su valor predicho, y no cambió durante el almacenamiento de las formulaciones de Prev(e)nar 13 con el tiempo bien a 2-8 °C o a 37 °C. La concentración de 2-PE se midió con un ensayo de HPLC de fase inversa. Se agitaron con formación de vórtice las muestras y se diluyeron a 1:10 en un tampón de succinato 5 mM en solución salina, se centrifugaron y se diluyeron de nuevo a 1:10 en un tampón de succinato 5 mM en solución salina. La dilución final de la muestra de ensayo fue de 1:100. El ensayo utilizó la columna de HPLC Agilent Eclipse XDB-C18, y un gradiente lineal de agua y acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético. Se cuantificó el 2-PE en las muestras de vacunas multidosis de 13vPnC frente a una curva patrón de 2-PE. Véase también, Sharma y col., *Biologicals* 36(1): 61-63 (2008).

Ejemplo 4 - Ensayo de eficacia de conservación mediante el procedimiento de múltiples exposiciones: Timerosal

Para evaluar la conveniencia de la política de viales abiertos multidosis de la OMS para las vacunas en varias

sesiones de inmunización hasta un máximo de cuatro semanas, se puso en práctica el diseño experimental proporcionado por la OMS. En este estudio, se evaluó la eficacia del Timerosal a la concentración que está presente en la mayoría de las vacunas con licencia en EE.UU. (0,01 %), así como a una mayor concentración del 0,02 %. Para representar el peor caso razonable de contaminación que puede ocurrir en la práctica durante el uso repetido de una presentación multidosis, y para analizar los requisitos de la OMS, se expusieron formulaciones vacunales Prev(e)nar 13 con Timerosal al 0,01 o al 0,02 % o con 5,0 mg/dosis de 2-PE deliberadamente a múltiples contaminaciones usando cepas bacterianas recomendadas por la OMS, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*. Las formulaciones se enriquecieron con 5×10^3 UFC/ml de cada organismo en los puntos temporales 0, 6 horas, 24 horas, 7 días y 14 días después de la exposición inicial, y se almacenaron a 2-8 °C o a 22-24 °C para imitar las posibles condiciones de almacenamiento en la práctica. También se usó la formulación de solución salina que contenía Timerosal al 0,02 % como control para evaluar el impacto potencial de Prev(e)nar 13 sobre la eficacia antimicrobiana de Timerosal en la formulación.

Tras múltiples contaminaciones deliberadas de la formulación de vacuna Prev(e)nar 13 en ausencia de un conservante, el nivel de los organismos *P. aeruginosa* y *E. coli* aumentó en el transcurso del estudio, especialmente cuando se almacenaron a 22-24 °C (**Figuras 8A y 8B**). El nivel de *S. aureus* en la formulación almacenada a 22-24 °C disminuyó lentamente, de manera similar a la observada durante el estudio de una sola exposición (**Figura 8A** en comparación con la **Figura 3**). La viabilidad de *B. subtilis* se redujo de manera aún más notable (**Figuras A y 8B**). Estos resultados sugieren que *B. subtilis* no es un organismo robusto en esta formulación para su uso como un modelo para dichos estudios de exposición en el ensayo de eficacia de los conservantes, a pesar de la recomendación de la OMS.

En la formulación de vacuna Prev(e)nar 13, la eficacia antibacteriana de Timerosal al 0,01 % fue superior en *B. subtilis* seguida de *P. aeruginosa*. Sin embargo, la reducción de *S. aureus* y *E. coli* fue lenta, en particular cuando las formulaciones se almacenaron a 2-8 °C (**Figuras 9A y 9B**).

Como se muestra en el análisis de regresión no lineal de la reducción de la viabilidad de *S. aureus* que se resume en la **Figura 12**, la velocidad de desintegración de *S. aureus* fue esencialmente más lenta (Log_{10} de la desintegración de -5,98 al día, con el 50 % de la desintegración a los 30,28 días) cuando se almacenó la formulación a 2-8 °C en comparación con la que se almacena a 22-24 °C (Log_{10} de la desintegración de -1,39 al día, con el 50 % de la desintegración a los 6,2 días) (**Figura 12**). Estos resultados muestran que el Timerosal al 0,01 % en una formulación de vacuna Prev(e)nar 13, que se contamina en el campo durante la administración de múltiples dosis y se almacena además a temperatura refrigerada, no será eficaz en la reducción de la contaminación bacteriana.

La eficacia del Timerosal dependió tanto de la concentración como de la temperatura (**Figuras 9 y 10**). El Timerosal fue un conservante más eficaz a la mayor concentración, del 0,02 %. También fue un conservante más eficaz a mayor temperatura de almacenamiento, de 22-24 °C. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, incluso con la concentración del 0,02 % y el almacenamiento a una temperatura de 22 a 24 °C, el Timerosal no cumplió los requisitos de la EP de EP-A ni EP-B cuando se aplicaron dichos criterios durante los estudios de múltiples exposiciones (**Figura 1**).

Para estudiar si la propia vacuna afecta o no a la acción conservante del Timerosal, se comparó la eficacia del Timerosal al 0,02 % con múltiples exposiciones entre la formulación de solución salina y de la vacuna Prev(e)nar. En presencia de Timerosal al 0,02 %, la velocidad de desintegración tanto de *S. aureus* como de *E. coli* fue más pronunciada en la formulación de solución salina que en la formulación de vacuna (**Figura 11** en comparación con la **Figura 10** y la **Figura 12**), lo que demuestra que la presencia de la vacuna, en cierta medida, inhibe la eficacia del Timerosal como conservante. Sin embargo, incluso en una formulación de control de solución salina que no contenía la vacuna, el Timerosal al 0,02 % seguía sin cumplir los criterios de aceptación de EP-A o EP-B ante múltiples exposiciones (**Figura 1**).

45 **Ejemplo 5 - Ensayo de eficacia de conservación mediante el procedimiento de múltiples exposiciones: 2-PE**

En contraste con la falta de eficacia del Timerosal como conservante, especialmente cuando se inoculó varias veces o se almacenó a 2-8 °C, la formulación de vacuna Prev(e)nar que contiene 5 mg/dosis de 2-PE como conservante da lugar a una fuerte inactivación de la viabilidad de *S. aureus*, independientemente del procedimiento de exposiciones (es decir, de una o de varias exposiciones) o la temperatura de almacenamiento (**Figura 12**).

De hecho, con el procedimiento de múltiples exposiciones, independientemente de la temperatura del almacenamiento, y con todos los organismos ensayados (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*), 2-PE a 5 mg/dosis fue superior como conservante frente al Timerosal al 0,01 %. En un análisis de regresión no lineal de la desintegración de *S. aureus* en estudios de varias exposiciones, las formulaciones vacunales con 2-PE tuvieron una mayor velocidad de descomposición de los contaminantes microbianos que aquellas con Timerosal tanto en términos del 50 % de desintegración como de la pendiente media de desintegración (log_{10} de desintegración/día). Véase la **Figura 12**. Además, 2-PE a 5 mg/dosis cumplió los criterios EP-B en múltiples exposiciones, mientras que ninguna versión de Timerosal fue capaz de hacerlo en las mismas condiciones (**Figura 13**).

El Timerosal no es un conservante eficaz en la protección de Prev(e)nar 13 en la formulación multidosis frente a la contaminación potencial que se puede introducir durante la dispensación. Esto es aún más evidente cuando la contaminación se introduce varias veces durante la administración a los sujetos en formulaciones multidosis. El Timerosal tiene una baja velocidad de inactivación, sobre todo frente a *S. aureus* y *E. coli*, con un efecto inmediato de retraso para eliminar los posibles microorganismos contaminantes cuando los médicos en general podrían retirar las vacunas de viales multidosis en condiciones higiénicas deficientes. Sin embargo, 2-PE a 3,5-5 mg/dosis es estable, con una tasa mucho más alta de eficacia antimicrobiana en comparación con el Timerosal y, por lo tanto, protegerá el producto contra la contaminación accidental mientras se administra a pacientes.

Ejemplo 6 - Respuesta inmune generada por la inmunización de Prevenar 13 con o sin 2-fenoxietanol como conservante en primates no humanos

Se evalúa la capacidad de Prevenar 13 y Prevenar 13 que contiene 2-fenoxietanol para inducir la respuesta inmune en macacos cangrejeros.

Para el estudio, se usan dos grupos de inmunización de 10 macacos para un total de 20 macacos cangrejeros como se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3

Grupo	Macacos/grupo	Vacuna	Volumen final	Administración
1	10	13vPnC	0,5 ml	IM
2	10	13vPnC + 5 mg de 2PE	0,5 ml	IM

Se distribuyen los animales previamente seleccionados aleatoriamente en grupos según sus pesos corporales y los títulos de referencia.

Los macacos reciben la dosis clínica de 13vPnC que contiene 0 o 5 mg de 2-fenoxietanol como conservante. La vacuna se administra por vía intramuscular en una sola zona del músculo cuádriceps de cada mono. El volumen final administrado es de 0,5 ml.

Todos los macacos reciben tres dosis y son vacunados en la semana 2, 4 y 8.

Pauta de extracción de sangre: se muestrea sangre periférica en las semanas 0, 6, 8, 10, 12 y 16 para controlar la inducción de las respuestas inmunes a las vacunas.

La respuesta inmune generada por la vacunación se controla mediante la realización de los siguientes ensayos en suero recogido durante el estudio:

- Anticuerpos de unión y funcionales *in vitro*:
 - IgG específica del serotipo mediante ELISA (véase, por ejemplo, Fernsten P, y col., *Hum Vaccin.* 1 de enero de 2011; 7:75-84).
 - Ensayo de opsonofagocitosis (OPA) específico del serotipo (véase, por ejemplo, Fernsten P, y col., *Hum Vaccin.* 1 de enero de 2011;7: 75-84)
- Protección *in vivo* en el modelo de exposición de ratas lactantes (véase, por ejemplo, Fernsten P, y col., *Hum Vaccin.* 21 de enero de 2011; 7:75-84):
 - se evalúa la mezcla de sueros de macaco para determinar la protección específica del serotipo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica multivalente que comprende conjugados de polisacárido-proteína que consisten en polisacáridos capsulares neumocócicos de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F conjugados individualmente con CRM₁₉₇, y que comprenden además 2-fenoxietanol (2-PE) a una concentración de entre 7 mg/ml y 15 mg/ml.
2. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende 2-PE a una concentración de 10 mg/ml.
3. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende 2-PE a una concentración de 4,0 mg/dosis, en la que la dosis es una dosis de 0,5 ml.
- 10 4. La composición inmunogénica multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha composición comprende además un adyuvante y en la que dicho adyuvante es fosfato de aluminio.
5. La composición inmunogénica multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la antigenicidad de la composición inmunogénica es estable durante no menos de 1 año, 1,5 años, 2 años o 2,5 años.
- 15 6. La composición inmunogénica multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que, tras la inoculación con uno o más microorganismos, la concentración de dichos microorganismos se reduce a lo largo del tiempo.
7. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 6, en la que las cepas de microorganismos son una o más cepas seleccionadas entre *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*.
- 20 8. La composición inmunogénica multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en la que la composición se inocula varias veces.
9. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 7 u 8, en la que se produce una segunda inoculación a las 6 horas de la inoculación inicial, se produce una tercera inoculación a las 24 horas de la inoculación inicial, se produce una tercera inoculación a los 7 días de la inoculación inicial y se produce una cuarta inoculación a los 14 días de la inoculación inicial.
- 25 10. La composición inmunogénica multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dicha composición comprende además uno o más de un tampón, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico y un inhibidor de la oxidación de los radicales libres.
- 30 11. Una formulación de la composición inmunogénica multivalente de polisacáridos capsulares neumocócicos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, conjugados individualmente con CRM₁₉₇, en la que la composición inmunogénica multivalente está formulada en un líquido estéril para comprender: 4,4 µg/ml de cada polisacárido, a excepción de 6B a 8,8 µg/ml; proteína vehículo CRM₁₉₇ a 58 µg/ml; 0,25 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio; cloruro sódico al 0,85 %; polisorbato 80 al 0,02 %; tampón de succinato de sodio 5 mM a un pH de 5,8; y 10 mg/ml de 2-fenoxietanol.
- 35 12. Un vial que contiene una composición inmunogénica multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
13. El vial de la reivindicación 12, en el que dicho vial contiene más de una dosis de la composición inmunogénica.
14. Un dispositivo de administración de vacuna precargado que comprende una composición inmunogénica multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
15. El dispositivo de administración de vacuna precargado de la reivindicación 14, en el que dicho dispositivo es o comprende una jeringa.
- 40 16. Un kit de preparación de la composición inmunogénica multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el kit comprende (i) dicha pluralidad de polisacáridos capsulares en una forma liofilizada de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores; y (ii) material acuoso para reconstituir el componente (i) con el fin de proporcionar la composición acuosa.
- 45 17. Un recipiente que comprende dos dosis o más, de 0,1 a 2 ml por dosis, de la composición inmunogénica multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
18. El recipiente de la reivindicación 17 en el que la dosis es una dosis de 0,5 ml.
19. El recipiente de la reivindicación 17-18 que comprende de 2 a 10 dosis.

Figura 1

Eficacia del Timerosal en diversas formulaciones

Formulación	Conc. de Hg del Timerosal µg/dosis (%)	Conc. de Hg medida µg/dosis	Varias exposiciones ^(§)		Una sola exposición	
			EP (A)	EP (B)	EP (A)	EP (B)
Prev(e)nar 13™	100 µg (0,04)	ND	ND	ND	EP (A)	EP (B)
Prev(e)nar 13™	50 µg (0,02)	41,4 ± 2,9	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos
Prev(e)nar 13™	25 µg (0,01)	22,0 ± 3,6	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos
Control salino	50 µg (0,02)	43,2 ± 3,7	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos	Criterios no cumplidos

ND significa no determinado

La concentración de mercurio real medida por CVAAS es la media ± la desviación típica por triplicado

Para los estudios de varias exposiciones, solo se evaluó el procedimiento de eficacia antibacteriana resumido en EP, y no los criterios anti-levadura o anti-moho.

Figura 2

Eficacia y estabilidad de 2-EP en la formulación de vacuna a diversas concentraciones

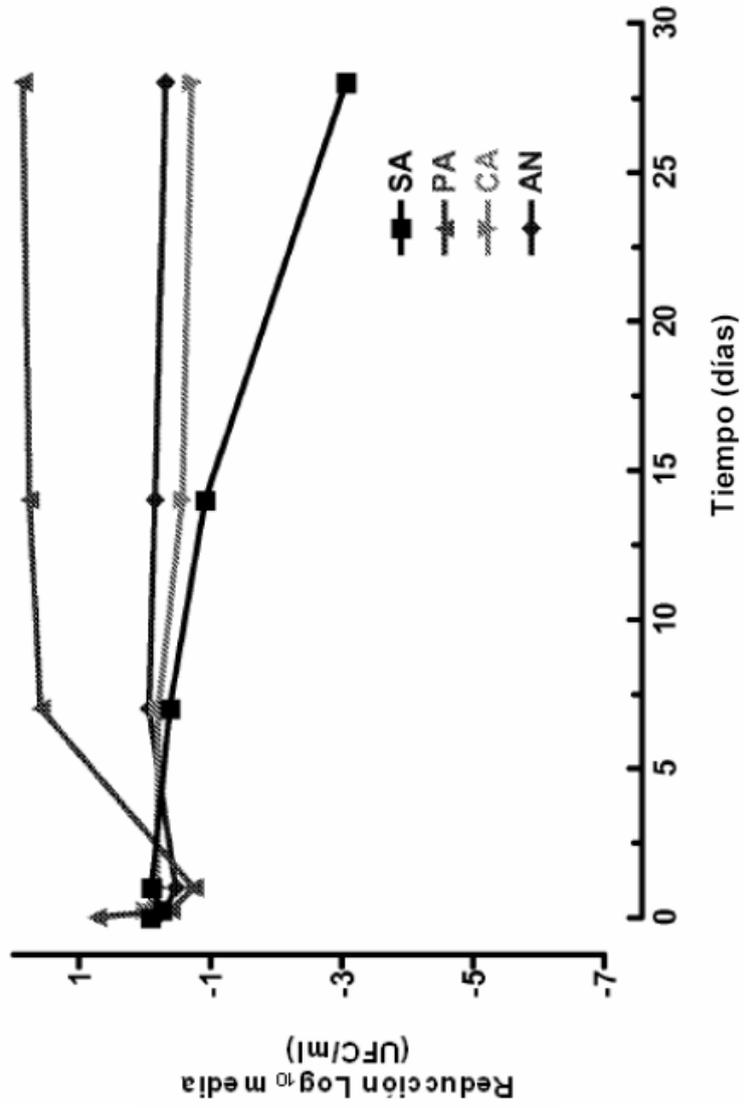
Formulación	Conc. de 2-EP mg/dosis	Conc. de 2-EP medida, mg/dosis	Duración/ condiciones del almacenamiento		Una sola exposición	
			EP (A)	EP (B)	EP (A)	EP (B)
Prev(e)nar I3	0	ND	0	No cumplidos	No cumplidos	No cumplidos
Prev(e)nar I3	0	ND	1 mes/ 37 °C	No cumplidos	No cumplidos	No cumplidos
Prev(e)nar I3	0	ND	2,5 años/2-8 °C	No cumplidos	No cumplidos	No cumplidos
Prev(e)nar I3	2,5	ND	0	No cumplidos	No cumplidos	No cumplidos
Prev(e)nar I3	2,5	ND	1 nes/37 °C	No cumplidos	No cumplidos	No cumplidos
Prev(e)nar I3	3,5	3,4	0	No cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	3,5	3,3	1 nes/37 °C	No cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	3,5	3,5	2,5 años/2-8 °C	No cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	4,5	ND	0	No cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	4,5	ND	1 nes/37 °C	No cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	5,0	4,8	0	No cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	5,0	4,8	1 nes/37 °C	No cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	5,0	5,2	2,5 años/2-8 °C	No cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	5,5	ND	0	No cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	5,5	ND	1 nes/37 °C	Cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	6,0	ND	0	Cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	6,0	ND	1 nes/37 °C	Cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	6,5	ND	0	Cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	6,5	ND	1 nes/37 °C	Cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	7,0	ND	0	Cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	7,0	ND	1 nes/37 °C	Cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	7,5	7,3	0	Cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	7,5	7,2	1 nes/37 °C	Cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	7,5	7,6	2,5 años/2-8 °C	Cumplidos	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	8,0	ND	0	ND	Cumplidos	Cumplidos
Prev(e)nar I3	10,0	ND	0	ND	Cumplidos	Cumplidos

ND significa no determinado

La concentración de 2-EP real se midió mediante HPLC de fase inversa

Figura 3

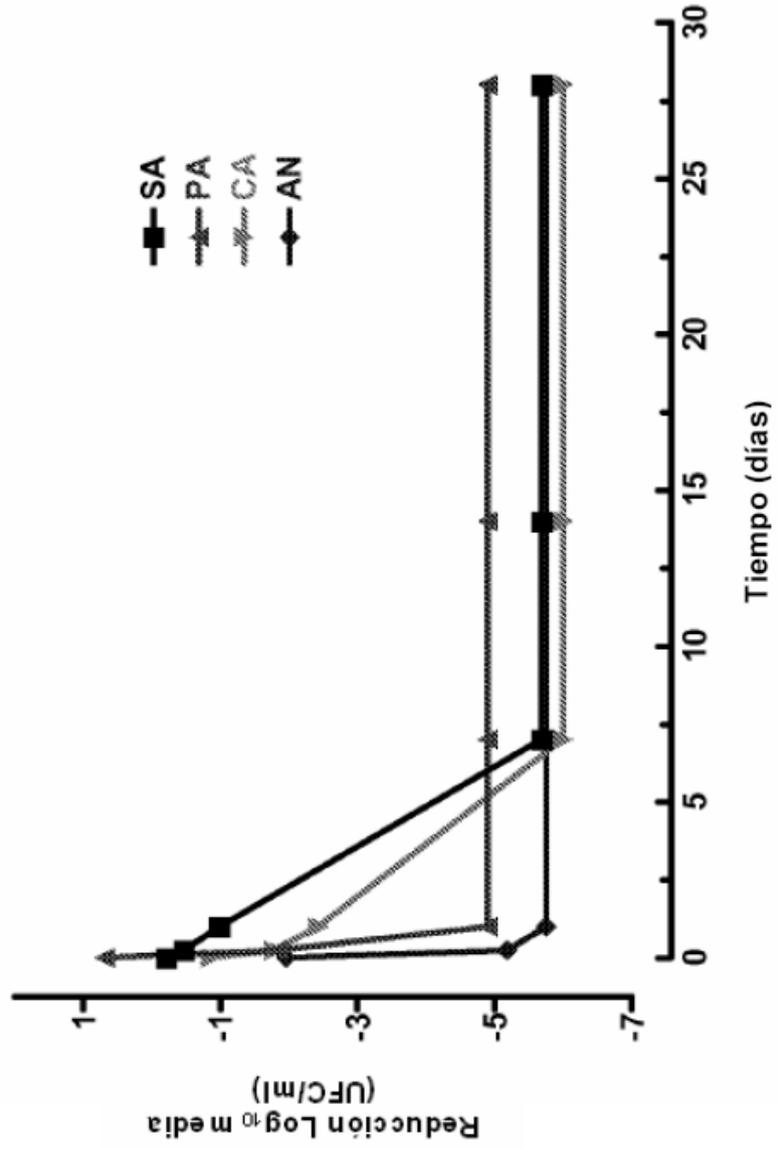
Una sola exposición - Formulación de vacuna Prev(e)nar 13 sin conservantes a 20-25



SA = *Staphylococcus aureus*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; CA = *Candida albicans*; AN = *Aspergillus niger*

Figura 4

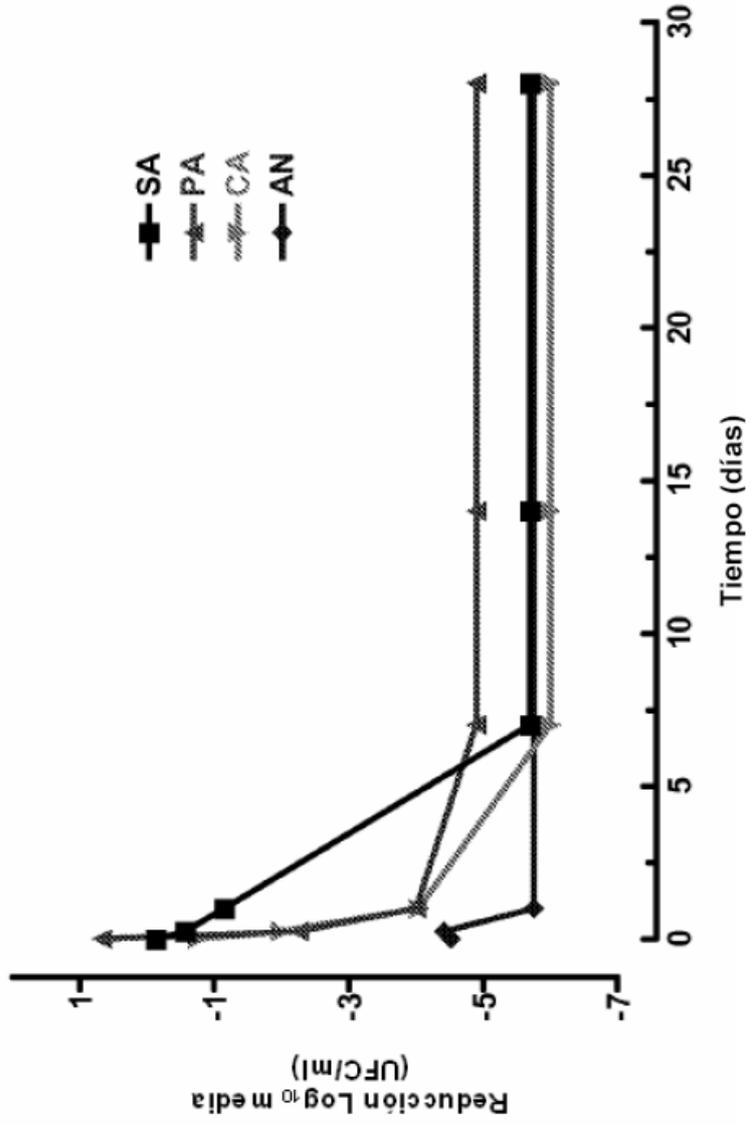
Una sola exposición - Formulación de vacuna con Timerosal al 0,01 % a 20-25 °C



SA = *Staphylococcus aureus*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; CA = *Candida albicans*; AN = *Aspergillus niger*

Figura 5

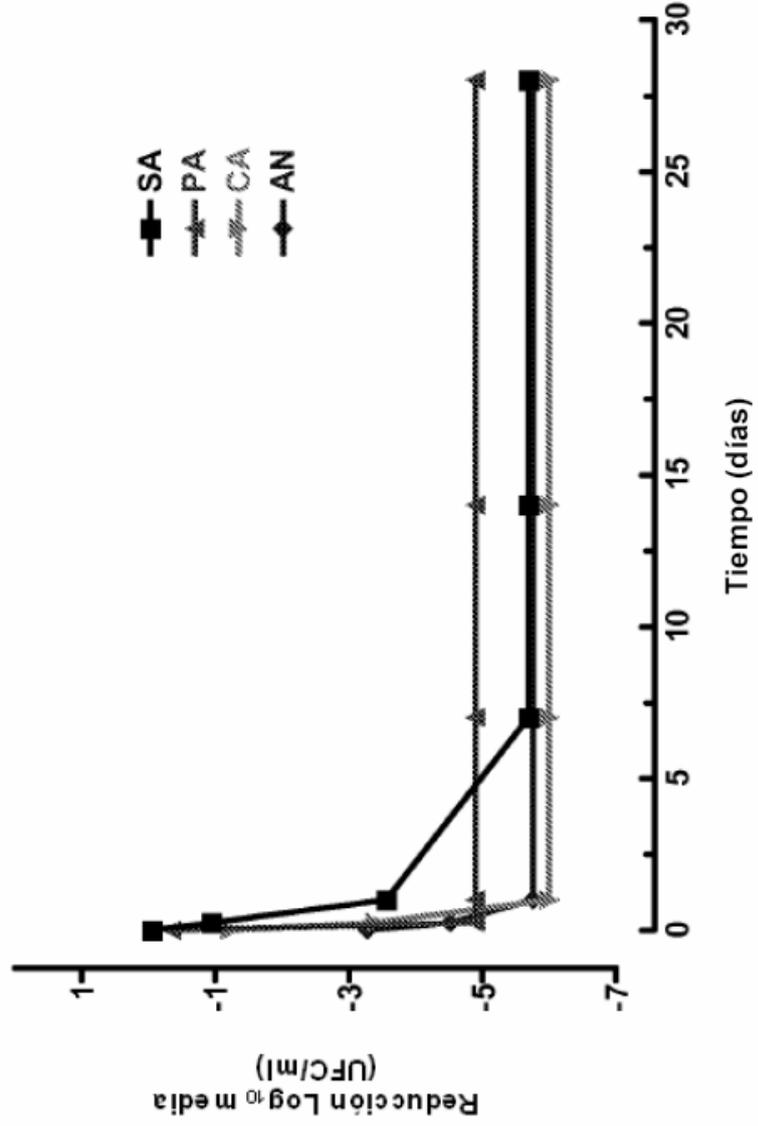
Una sola exposición - Formulación de vacuna con Timerosal al 0,02 % a 20-25 °C



SA = *Staphylococcus aureus*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; CA = *Candida albicans*; AN = *Aspergillus niger*

Figura 6

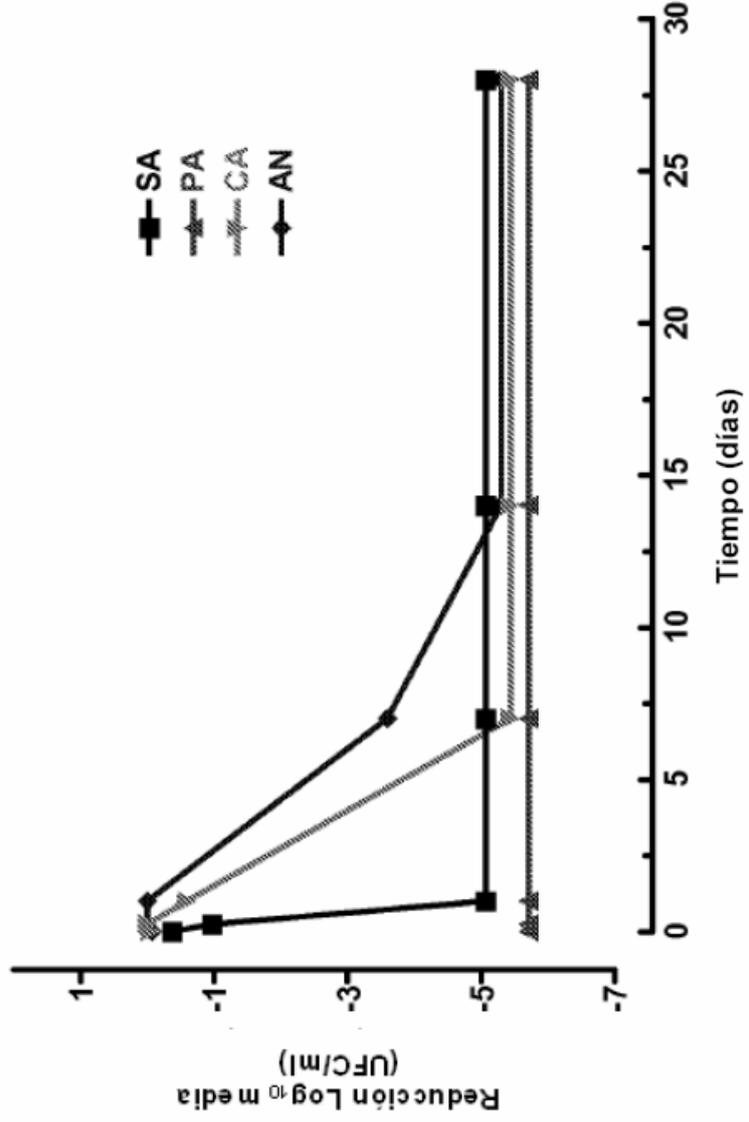
Una sola exposición - Solución salina con Timerosal al 0,02 % a 20-25 °C



SA = *Staphylococcus aureus*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; CA = *Candida albicans*; AN = *Aspergillus niger*

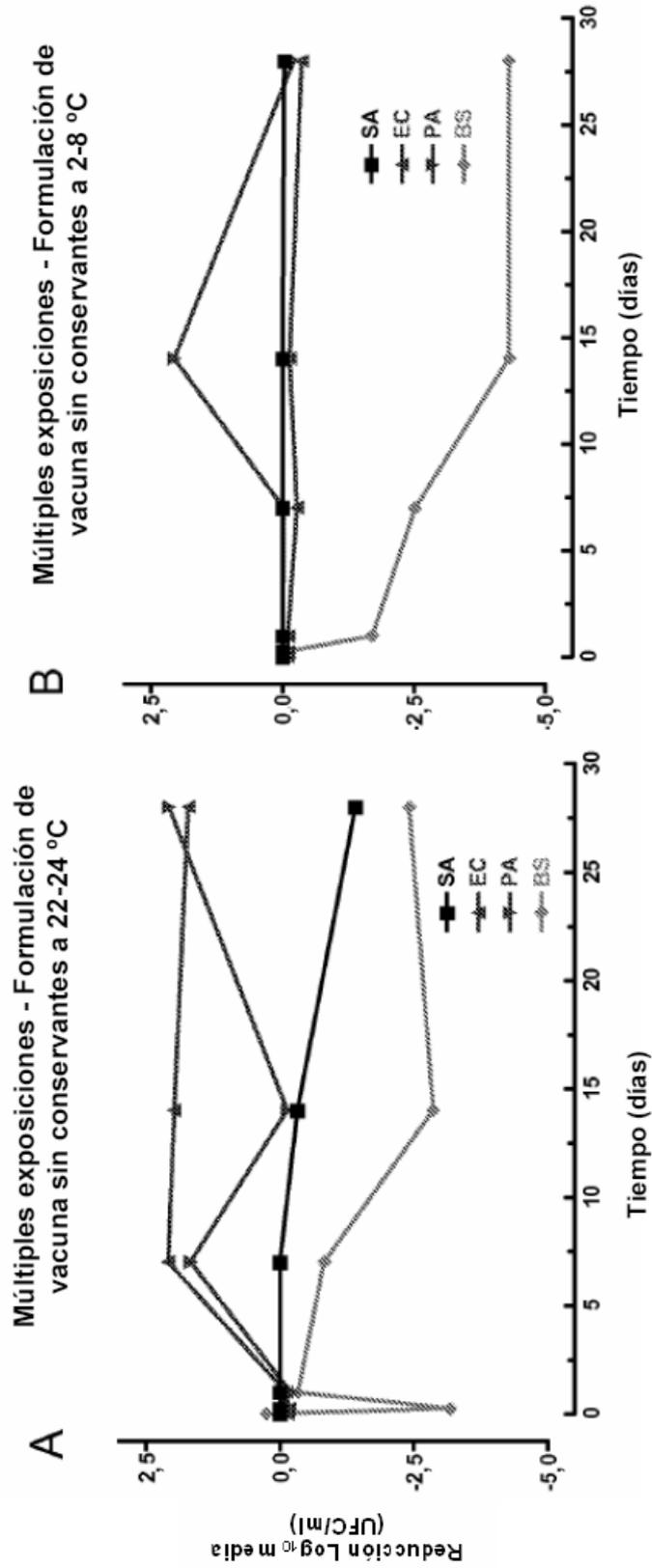
Figura 7

Una sola exposición - Formulación de vacuna con 2-fenoxietanol a 5 mg/0,5 ml a 20-25 °C



SA = *Staphylococcus aureus*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; CA = *Candida albicans*; AN = *Aspergillus niger*

Figura 8



SA = *Staphylococcus aureus*; EC = *E. coli*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; BS = *B. subtilis*

Figura 9

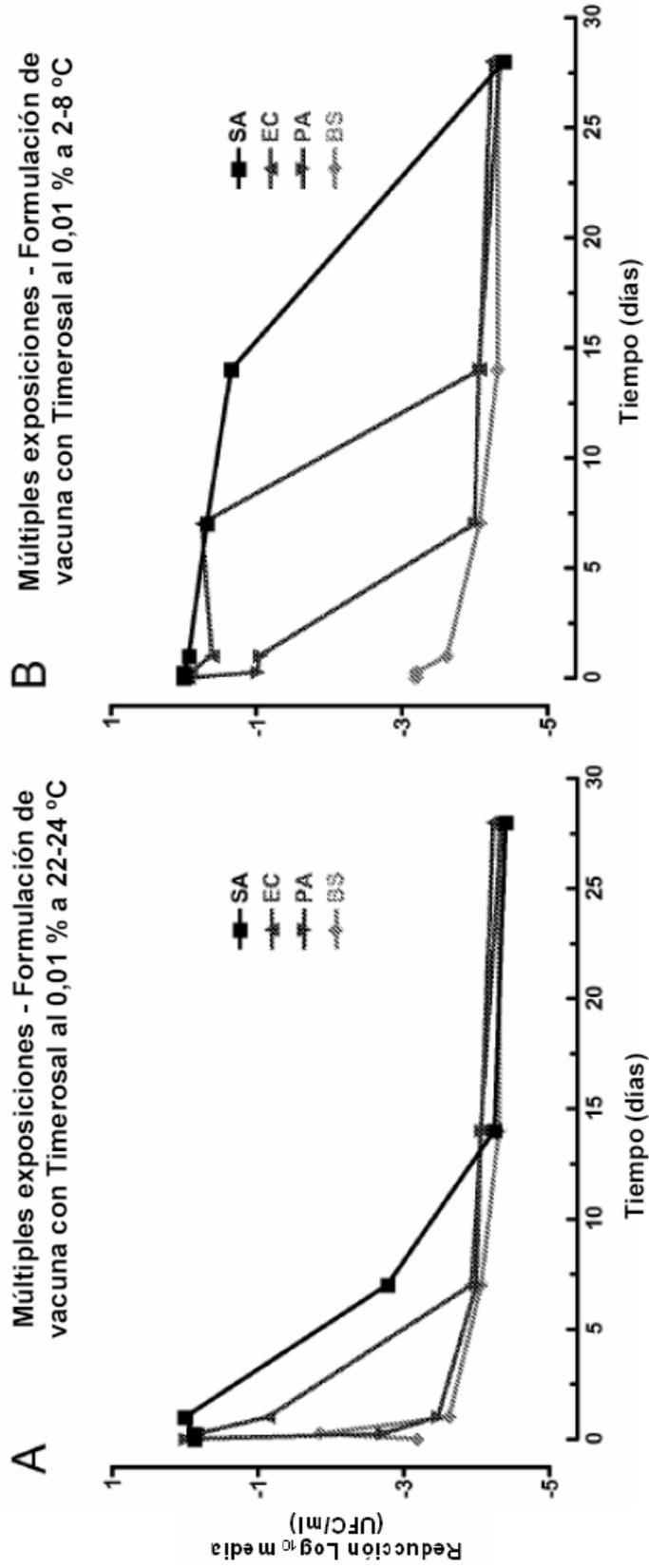
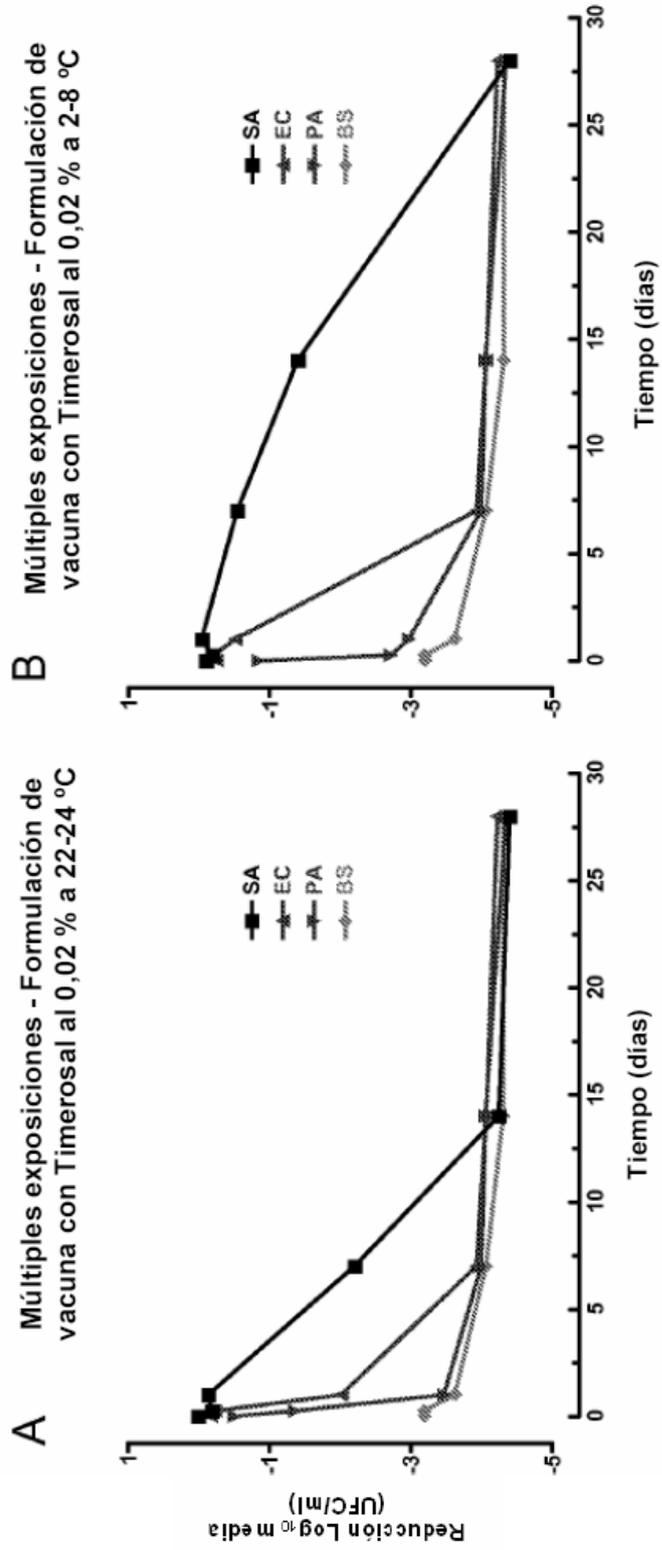


Figura 10



SA = *Staphylococcus aureus*; EC = *E. coli*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; BS = *B. subtilis*

Figura 11

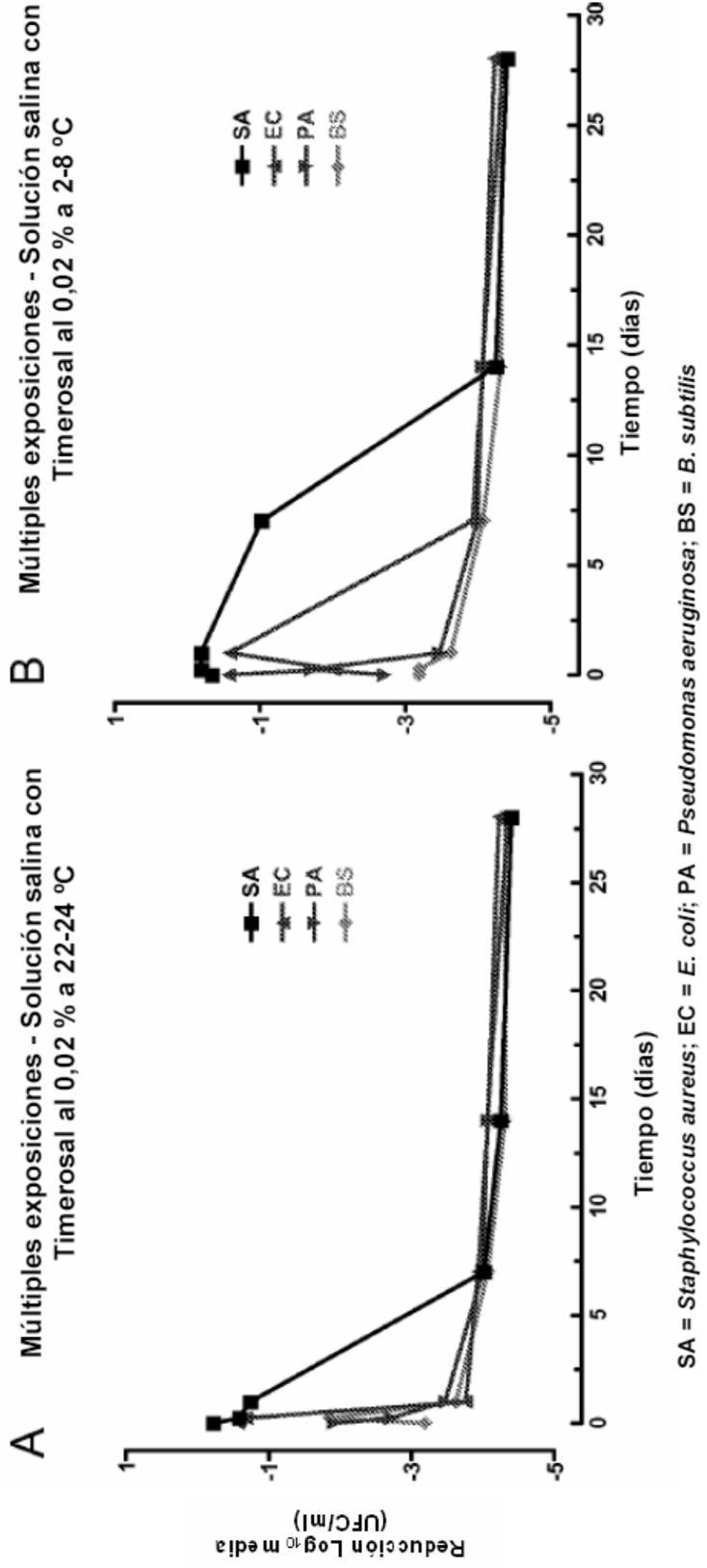


Figura 12

Análisis de regresión no lineal de desintegración de *S. aureus* en estudios de diversas exposiciones

Formulación	Procedimiento	Temp. tras exposición (°C)	Desintegración del 50 % (Días)	Pendiente (log ₁₀ de desintegración/día)	R ²
Vacuna + 2-PE a 5 mg/dosis	Una exposición	20 – 25	0,45	-0,15	0,99
vacuna + Timerosal al 0,01 %	Una exposición	20 – 25	2,11	-0,72	0,99
Solución salina + Timerosal al 0,02 %	Una exposición	20 – 25	0,84	-0,31	1,00
Vacuna + Timerosal al 0,02 %	Una exposición	20 – 25	1,86	-0,64	0,99
Vacuna + 2-PE a 5 mg/dosis	Múltiples exposic.	22 – 24	0,14	-0,13	0,98
vacuna + Timerosal al 0,01 %	Múltiples exposic.	22 – 24	6,20	-1,39	0,99
Solución salina + Timerosal al 0,02 %	Múltiples exposic.	22 – 24	3,28	-1,41	0,99
Vacuna + Timerosal al 0,02 %	Múltiples exposic.	22 – 24	6,97	-1,82	0,99
Vacuna + 2-PE a 5 mg/dosis	Múltiples exposic.	2 – 8	0,03	-0,07	0,96
vacuna + Timerosal al 0,01 %	Múltiples exposic.	2 – 8	30,28	-5,98	0,99
Solución salina + Timerosal al 0,02 %	Múltiples exposic.	2 – 8	9,13	-1,47	0,99
Vacuna + Timerosal al 0,02 %	Múltiples exposic.	2 – 8	19,24	-5,27	0,99

Figura 13

Conservante	Dosis diana de 0,5 ml	Criterios EP-B* de múltiples exposiciones	Criterios EP-B* de una sola exposición
Ninguno	0	No cumplidos	No cumplidos
Referencia de Timerosal	50 µg de Hg	No cumplidos	Cumplidos
Referencia de Timerosal	25 µg de Hg	No cumplidos	No cumplidos
Control de soluc. salina	50 µg de Hg	No cumplidos	Cumplidos
2-PE	5,0 mg	Cumplidos	Cumplidos
Criterios 5.1.3 "B" de criterios de *EP			

Figura 14

Estabilidad a largo plazo de Prev(e)nar 13 que contiene 2-PE

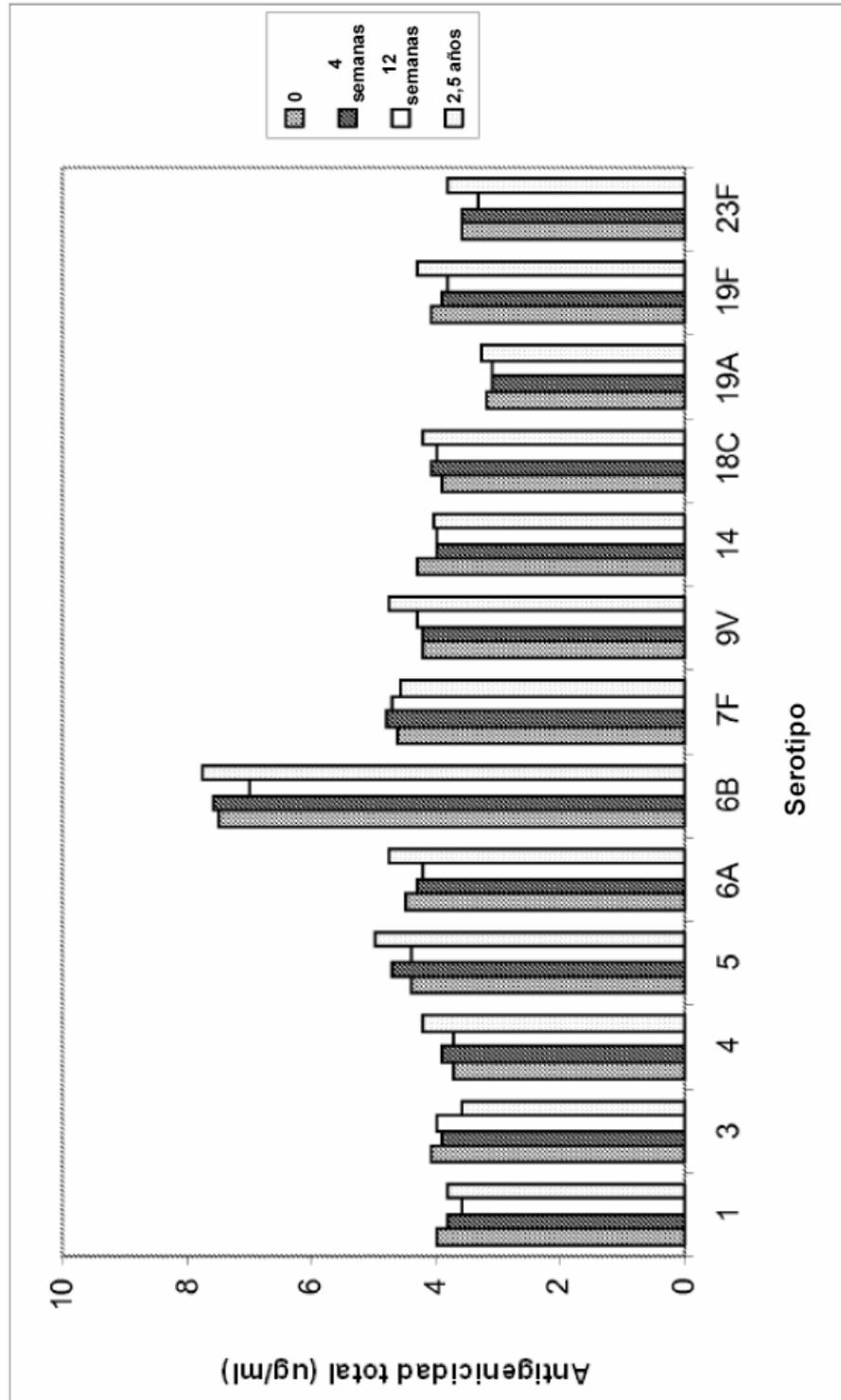
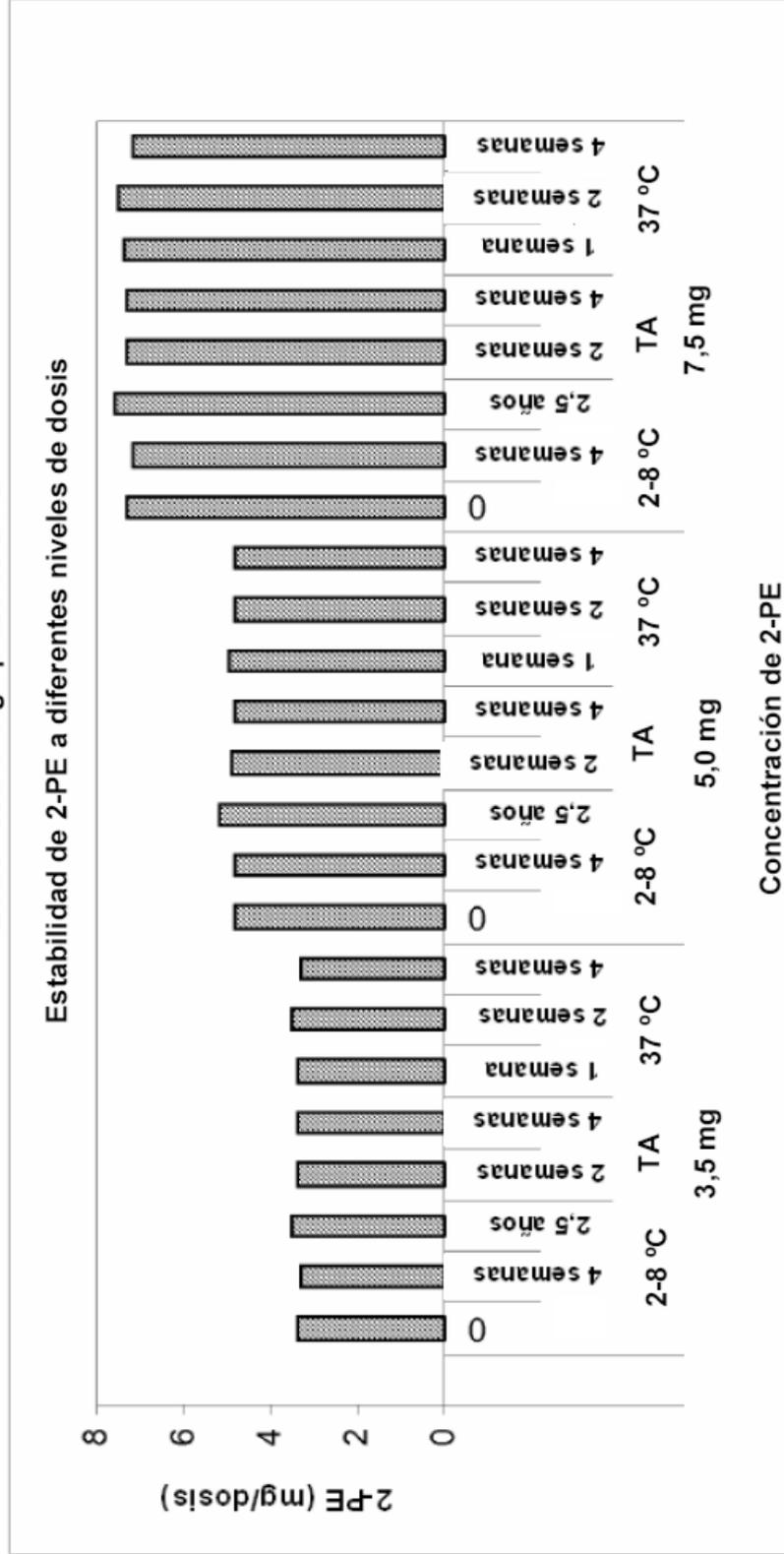


Figura 15

Estabilidad a largo plazo de 2-PE



2-PE en formulación de Prev(e)nar 13 es estable durante 2,5 años a 2-8 °C