

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 938**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2006 E 10192663 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2384765**

54 Título: **Vacuna de Streptococcus pneumoniae**

30 Prioridad:

22.12.2005 GB 0526232 07.04.2006 GB 0607087
07.04.2006 GB 0607088 18.05.2006 GB 0609902
12.10.2006 GB 0620336 12.10.2006 GB 0620337
19.10.2006 GB 0620815 19.10.2006 GB 0620816
12.12.2006 WO PCT/GB2006/004634

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2017

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

BIEMANS, RALPH LEON;
GARCON, NATHALIE MARIE-JOSEPHE;
HERMAND, PHILIPPE VINCENT;
POOLMAN, JAN y
VAN MECHELEN, MARCELLE PAULETTE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 614 938 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna de *Streptococcus pneumoniae*

Campo de la invención

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

5 Antecedentes de la invención

Los niños de menos de 2 años de edad no muestran una respuesta inmunitaria a la mayoría de las vacunas polisacáridicas, de manera que ha sido necesario hacer que los polisacáridos se vuelvan inmunogénicos mediante conjugación química a una proteína portadora. Acoplar el polisacárido, un antígeno independiente de T, a una proteína, un antígeno dependiente de T, confiere al polisacárido las propiedades de dependencia de T incluyendo cambio de isotipo, maduración de afinidad e inducción de memoria.

10 Sin embargo, no se puede conseguir con la administración repetida de conjugados de polisacárido-proteína, o con la combinación de conjugados de polisacárido-proteína para formar vacunas multivalentes. Por ejemplo, se ha indicado que una vacuna polisacáridica de *Haemophilus influenzae* de tipo b (PRP) que usa el toxoide tetánico (TT) como la proteína portadora se sometió a ensayos en un rango de dosificación con inmunización simultánea con TT (libre) y una vacuna de conjugado de polisacárido neumococal-TT que sigue un programa estándar para niños. Al incrementarse la dosificación de la vacuna neumococal, la respuesta inmunitaria a la porción de polisacárido PRP de la vacuna de conjugado Hib se redujo, indicando una interferencia inmunitaria del polisacárido, posiblemente por el uso de la misma proteína portadora (Dagan *et al.*, Infect Immun. (1998); 66: 2093-2098).

15 El efecto de la dosificación de proteína-portador sobre la respuesta humoral a la propia proteína se ha probado también que es multifacético. En niños se ha indicado que incrementar la dosificación de un conjugado de toxoide tetánico tetravalente dio como resultado una menor respuesta al portador del tétanos (Dagan *et al.* supra). Los análisis clásicos de estos efectos de vacunas de combinación se han descrito como supresión epitópica inducida por la portadora, lo que no se entiende del todo, pero se cree que se produce a partir de una cantidad excesiva de proteína portadora (Fattom, Vacuna 17: 126 (1999)). Esto parece dar como resultado la competición para las células Th, por las células B para la proteína portadora y las células B para el polisacárido. Si las células B para la proteína portadora predominan, no hay suficiente células Th para proporcionar la ayuda necesaria para las células B específicas para el polisacárido. Sin embargo, los efectos inmunológicos observados han sido inconsistentes, con la cantidad total de proteína portadora en algunos ejemplos incrementando la respuesta inmunitaria y en otros casos reduciendo la respuesta inmunitaria.

20 Por lo tanto, permanecen las dificultades técnicas combinando múltiples conjugados de polisacáridos en una única formulación de vacuna eficaz.

Streptococcus pneumoniae es una bacteria Gram-positiva responsable de una morbilidad y mortandad considerable (particularmente en los jóvenes y los ancianos), causando enfermedades invasivas tales como neumonía, bacteremia y meningitis y enfermedades asociadas con colonización, tales como otitis media aguda. La proporción de neumonía neumococal en los Estados Unidos para personas de más de 60 años de edad se estima que es de 3 a 8 por 100.000. En el 20 % de los casos esto conduce a la bacteremia y otras manifestaciones tales como la meningitis, con una proporción de mortandad cercana al 30 % incluso con tratamiento antibiótico.

25 El neumococo está encapsulado con un polisacárido químicamente unido que confiere especificidad de serotipo. Hay 90 serotipos conocidos de neumococos y la cápsula es el principal determinante de virulencia para los neumococos, puesto que la cápsula no solamente protege la superficie interna de las bacterias del complemento sino ella misma es escasamente inmunogénica. Los polisacáridos son antígenos independientes de T y no pueden procesarse o presentarse sobre moléculas MHC para interactuar con las células T. Sin embargo, pueden estimular el sistema inmunitario a través de un mecanismo alternativo que implica la reticulación de los receptores de superficie sobre las células B.

30 Se ha mostrado en diversos experimentos que la protección contra la enfermedad por neumococos está correlacionada fuertemente con anticuerpo específico para la cápsula y la protección es específica de serotipo.

Streptococcus pneumoniae es la causa más común de enfermedad invasiva y otitis media en niños pequeños y niños jóvenes. Los ancianos proporcionan respuestas pobres a las vacunas neumococales [Roghmann *et al.*, (1987), J. Gerontol. 42:265-270], de ahí, la mayor incidencia de neumonía bacteriana en esta población [Verghese y Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].

35 Los principales síntomas clínicos causados por *S. pneumoniae* son ampliamente reconocidos y mencionados en todos los libros de textos estándar de medicina (Fedson DS, Muscher DM. en: Plotkin SA, Orenstein WA, editores. Vacunas. 4ª edición. Philadelphia WB Saunders Co, 2004a: 529-588). Por ejemplo, la enfermedad neumococal invasiva (ENI) se define como cualquier infección en la que *S. pneumoniae* se aísla de la sangre y otro sitio normalmente estéril (Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. en Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious diseases (5ª ed.) Nueva York, Churchill Livingstone, 2001, p. 2128-2147). La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se reconoce puesto que comprende diversas afecciones (obstrucción del flujo de aire, bronquitis crónica, bronquiolitis o enfermedad de las vías aéreas menores y enfisema) que a menudo coexisten. Los pacientes padecen exacerbación de su afección lo que se asocia normalmente con mayor dificultad de respiración y a menudo tienen exacerbadísimo lo que puede ser productivo de mocos o esputo purulento (Wilson, Eur Respir J 2001 17:995-1007). La EPOC se define fisiológicamente por la presencia de obstrucción irreversible o parcialmente reversible de las vías aéreas en pacientes con bronquitis crónica y/o enfisema (Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med. noviembre 1995; 152(5 Pt 2):S77-121). Las exacerbaciones de la EPOC son a menudo causadas por

infección bacteriana (por ejemplo neumococal) (Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. Clin Microbiol Rev. abril de 2001; 14(2):336-63).

El documento WO03/051392 describe una vacuna de *Streptococcus pneumoniae* que comprende 11 o más polisacáridos de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* conjugados a 2 o más proteínas portadoras, donde los polisacáridos de serotipos 6B, 19F y 23F están conjugados a una primera proteína portadora y los serotipos restantes están conjugados a 1 o 2 proteínas portadoras secundarias y donde la(s) proteína(s) secundaria(s) es/son diferente(s) de la primera proteína portadora.

De este modo un objeto de la presente invención es desarrollar una formulación mejorada de una vacuna de conjugado polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* de serotipo múltiple.

10 Breve descripción de las figuras

Figura 1 Diagrama de barras que muestra inmunogenicidad de conjugado 11-valente en monos rhesus ancianos. Las barras más claras representan el GMC después de dos inoculaciones con conjugado 11-valente en adyuvante de fosfato de aluminio. Las barras más oscuras representan el GMC después de dos inoculaciones con conjugado 11-valente en adyuvante C.

15 **Figura 2** Diagrama de barras que muestra células B de memoria para PS3 después de inoculación con el conjugado 11-valente en adyuvante C o adyuvante de fosfato de aluminio.

Figura 3 Diagrama de barras que muestra inmunogenicidad antipolisacárido 19F en ratones Balb/C para los polisacáridos solos tetravalentes y los conjugados de dPly tetravalentes.

20 **Figura 4** Diagrama de barras que muestra inmunogenicidad antipolisacárido 22F en ratones Balb/C para los polisacáridos solos tetravalentes y los conjugados PDT tetravalentes.

Figura 5 Diagrama de barras que muestra respuesta IgG anti-22F en los ratones Balb/c.

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

Figura 7 Diagrama de barras que compara las respuestas IgG inducidas en ratones jóvenes C57B1 después de la inmunización con la vacuna de conjugado 13-valente formulada en diferentes adyuvantes.

25 **Figura 8** Diagrama de barras que muestra la eficacia protectora de diferentes combinaciones de vacuna en un modelo de neumonía del mono.

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

30 **Figura 10** Protección contra inoculación neumococal de tipo 4 en ratones después de inmunización con 22F-PhtD o 22F-AH-PhtD.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una vacuna de *Streptococcus pneumoniae* que comprende 10 o más (por ejemplo 11, 12, 13, 14, o 15 o más) sacáridos capsulares de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* conjugados a una proteína portadora y que comprenden 3 o más proteínas portadoras diferentes, en la que la composición comprende sacárido capsular de serotipo 19F sacárido conjugado a toxoide de la difteria (DT), sacárido capsular de serotipo 18C conjugado a toxoide tetánico (TT), sacáridos capsulares de serotipo 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V y 23F conjugados a proteína D de *Haemophilus influenzae*.

35 Para los fines de la invención, "inmunizar un huésped humano contra exacerbaciones de EPOC" o "tratamiento o prevención de exacerbaciones de EPOC" o "reducción en severidad de exacerbaciones de EPOC" se refiere a una reducción en la incidencia o nivel de exacerbación de EPOC (por ejemplo una reducción en proporción del 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 % o más) o una reducción en severidad de las exacerbaciones de EPOC como se definen anteriormente, por ejemplo en un grupo de pacientes inmunizados con las composiciones o vacunas de la invención.

40 Típicamente la vacuna de *Streptococcus pneumoniae* de la vacuna de la presente invención comprenderá antígenos de sacáridos capsulares (preferiblemente conjugados), en los que los sacáridos se derivan de al menos 10 serotipos de *S. pneumoniae*. El número de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* puede variar entre 10 diferentes serotipos (o "V", valencias) y 23 diferentes serotipos (23V). En una realización hay 10, 11, 12, 13, 14 o 15 diferentes serotipos. En otra realización de la invención, la vacuna puede comprender sacáridos conjugados de *S. pneumoniae* y sacáridos no conjugados de *S. pneumoniae*. Preferiblemente, el número total de serotipos de sacárido es inferior o igual a 23. Por ejemplo, la invención puede comprender 10 serotipos conjugados y 13 sacáridos no conjugados. De una manera similar, la vacuna puede comprender 11, 12, 13, 14, 15 o 16 sacáridos conjugados y 12, 11, 10, 9, 8 o 7, respectivamente, sacáridos no conjugados.

45 En una realización la vacuna neumococal multivalente de la invención se seleccionará a partir de los siguientes serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F, aunque se apreciará que uno u otros dos serotipos podrían sustituirse dependiendo de la edad del receptor que recibe la vacuna y la ubicación geográfica donde la vacuna será administrada, por ejemplo el serotipo 6A puede estar incluido en la lista. Por ejemplo, una vacuna 10-valente puede comprender polisacáridos de serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Una vacuna 11-valente también puede comprender sacáridos de serotipo 3. Una vacuna pediátrica (niños) 12 o 13-valente también puede incluir la formulación 10 o 11-valente suplementada con serotipos 6A y 19A, o 6A y 22F, o 19A y 22F, o 6A y 15B, o 19A y 15B, o 22F y 15B, mientras que una vacuna para ancianos 13-valente

puede incluir la formulación 11-valente suplementada con los serotipos 19A y 22F, 8 y 12F, o 8 y 15B, o 8 y 19A, o 8 y 22F, o 12F y 15B, o 12F y 19A, o 12F y 22F, o 15B y 19A, o 15B y 22F. Una vacuna pediátrica 14-valente puede incluir la formulación de 10 valencias descrita anteriormente suplementada con los serotipos 3, 6A, 19A y 22F; serotipos 6A, 8, 19A y 22F; serotipos 6A, 12F, 19A y 22F; serotipos 6A, 15B, 19A y 22F; serotipos 3, 8, 19A y 22F; serotipos 3, 12F, 19A y 22F; serotipos 3, 15B, 19A y 22F; serotipos 3, 6A, 8 y 22F; serotipos 3, 6A, 12F y 22F; o serotipos 3, 6A, 15B y 22F.

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

La vacuna de la presente invención puede comprender proteína D (PD) de *Haemophilus influenzae* (véase por ejemplo el documento EP 0594610). *Haemophilus influenzae* es un organismo causativo clave de la otitis media y los autores de la presente invención han mostrado que incluir esta proteína en una vacuna de *Streptococcus pneumoniae* proporcionará un nivel de protección contra la otitis media relacionada con *Haemophilus influenzae* (publicación POET de referencia). En una realización, la composición de vacuna comprende proteína D. En un aspecto, PD está presente como una proteína portadora para uno o más de los sacáridos. En otro aspecto, la proteína D podría estar presente en la composición de vacuna como una proteína libre. En otro aspecto, la proteína D está presente como una proteína portadora y como una proteína libre. La proteína D se puede usar como una proteína de longitud total o como un fragmento (documento WO0056360). En otro aspecto, la proteína D está presente como una proteína portadora para la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8, 9 o más de los sacáridos puede estar conjugados a la proteína D. En este aspecto, la proteína D también puede estar presente también como proteína libre.

La vacuna de la presente invención comprende tres o más tipos diferentes de proteína portadora. Cada tipo de proteína portadora puede actuar como portadora para más de un sacárido, dichos sacáridos pueden ser idénticos o diferentes. Por ejemplo, los serotipos 3 y 4 se pueden conjugar a la misma proteína portadora, bien a la misma molécula de proteína portadora o bien a moléculas diferentes de la misma proteína portadora. En una realización, dos o más sacáridos pueden estar conjugados a la misma proteína portadora, bien a la misma molécula de proteína portadora o bien a diferentes moléculas de la misma proteína portadora.

Cada sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* puede estar conjugado a una proteína portadora independientemente seleccionada del grupo que consiste en fusiones de TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, PhtD, PhtDE (particularmente las descritas en los documentos WO 01/98334 y WO 03/54007), neumolisina detoxificada y proteína D, distintas del sacárido de serotipo 19F que siempre está conjugado a DT o a CRM 197, preferiblemente DT. Una lista más completa de portadores de proteína que pueden usarse en los conjugados de la invención está presente más adelante

Si el portador proteico es el mismo para 2 o más sacáridos en la composición, los sacáridos se podrían conjugar a la misma molécula del portador proteico (moléculas portadoras que tienen 2 sacáridos diferentes conjugados al mismo) [véase por ejemplo el documento WO 04/083251]. Alternativamente los sacáridos pueden cada uno conjugarse separadamente a diferentes moléculas del portador proteico (teniendo cada molécula del portador proteico un tipo de sacárido conjugado a la misma).

La proteína portadora conjugada a uno o más sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* en los conjugados presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención es opcionalmente un miembro de las proteínas de la familia de la triada de polihistidina (Pht), los fragmentos o las proteínas de fusión de las mismas. Las proteínas PhtA, PhtB, PhtD o PhtE pueden tener una secuencia de aminoácidos que comparte el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con una secuencia descrita en los documentos WO 00/37105 o WO 00/39299 (por ejemplo con secuencia de aminoácidos 1-838 o 21-838 de SEQ ID NO: 4 del documento WO 00/37105 para PhtD). Por ejemplo, las proteínas de fusión se componen de longitud total o fragmentos de 2, 3 o 4 de PhtA, PhtB, PhtD, PhtE. Ejemplos de proteínas de fusión son PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E, PhtD/A, PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B y PhtE/D, en los que las proteínas están unidas con lo primero mencionado en el extremo N-terminal (véase por ejemplo el documento WO01/98334).

Donde se usan los fragmentos de proteínas Pht (separadamente o como parte de una proteína de fusión), cada fragmento contiene opcionalmente uno o más resto(s) de tríada de histidina y/o regiones enrolladas en espiral de tales polipéptidos. Un resto de tríada de histidina es la porción de polipéptido que tiene la secuencia HxxHxH donde H es histidina y x es un aminoácido distinto de la histidina. Una región enrollada en espiral es una región predicha por el algoritmo de "Coils" Lupus, A et al (1991) Science 252; 1162-1164. En una realización el o cada fragmento incluye uno o más restos de tríada de histidina así como una región enrollada en espiral. En una realización, el o cada fragmento contiene exactamente o al menos 2, 3, 4 o 5 restos de tríada de histidina (opcionalmente, con secuencia de Pht nativo entre las 2 o más tríadas, o secuencia intra-tríada que es más del 50, 60, 70, 80, 90 o el 100 % idéntica a una secuencia de Pht intra-tríada neumococal nativa –por ejemplo la secuencia intra-tríada mostrada en la SEQ ID NO: 4 del documento WO 00/37105 para PhtD). En una realización, el o cada fragmento contiene exactamente o al menos 2, 3 o 4 regiones enrolladas en espiral. En una realización una proteína Pht divulgada en el presente documento incluye la proteína de longitud total con la secuencia señal fijada, la proteína de longitud total madura con el péptido señal (por ejemplo 20 aminoácidos en el extremo N-terminal) eliminado, variantes que se dan en la naturaleza de la proteína Pht y de los fragmentos inmunogénicos de la proteína Pht (por ejemplo fragmentos como se describen anteriormente o polipéptidos que comprenden al menos 15 o 20 aminoácidos contiguos de una

secuencia de aminoácidos en los documentos WO00/37105 o WO00/39299 en los que dicho polipéptido es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica para dicha secuencia de aminoácidos en los documentos WO00/37105 o WO00/39299).

En particular, el término "PhtD" como se usa en el presente documento incluye la proteína de longitud total con la secuencia señal fijada, la proteína de longitud total madura con el péptido señal (por ejemplo 20 aminoácidos en el extremo N-terminal) eliminado, variantes que se dan en la naturaleza de PhtD y fragmentos inmunogénicos de PhtD (por ejemplo los fragmentos como se describen anteriormente o polipéptidos que comprenden al menos 15 o 20 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos PhtD en los documentos WO00/37105 o WO00/39299 en los que dicho polipéptido es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica para dicha secuencia de aminoácidos PhtD en los documentos WO00/37105 o WO00/39299 (por ejemplo SEQ ID NO: 4 del documento WO 00/37105 para PhtD).

Si el portador proteico es el mismo para 2 o más sacáridos en la composición, los sacáridos se podrían conjugar a la misma molécula del portador proteico (moléculas portadoras que tienen 2 sacáridos más diferentes conjugados al mismo) [véase por ejemplo el documento WO 04/083251]. Alternativamente los sacáridos pueden cada uno estar conjugados separadamente a diferentes moléculas del portador proteico (teniendo solamente cada molécula de portador proteico un tipo de sacárido conjugado al mismo).

Ejemplos de proteínas portadoras que se pueden usar en la presente invención son DT (toxide de la difteria), TT (toxide tetánico) o fragmento C de TT, DT CRM197 (un mutante de DT) u otros mutantes puntuales de DT, tales como CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en *Genetically Engineered Toxins*, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; la delección o la mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones desquitas en las patentes US 4709017 o US 4950740; La mutación de al menos uno o más residuos de Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones divulgadas en los documentos US 5917017 o US 6455673; o el fragmento divulgado en la patente US 5843711, la neumolisina neumococal (Kuo et al (1995) *Infect Immun* 63; 2706-13) que incluye Ply detoxificado de alguna manera por ejemplo dPLY-GMBS (documentos WO 04081515, PCT/EP2005/010258) o dPLY-formol, PhtX, incluyendo PhtA, PhtB, PhtD, PhtE y fusiones de proteínas Pht por ejemplo fusiones de PhtDE, fusiones de PhtBE (documentos WO 01/98334 y WO 03/54007), (Pht A-E se describen en más detalle más adelante) EPOC (proteína de membrana externa meningococal – usualmente extraída del serogrupo B de *N. meningitidis* – documento EP0372501), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae* – véase, por ejemplo, el documento EP 0 594 610 B), o equivalentes inmunológicamente funcionales de los mismos, péptidos sintéticos (documentos EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas pépticas (documentos WO 98/58668, EP0471177), citocinas, linfocinas, factores u hormonas de crecimiento (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopes de células T CD4+ humanas de diversos antígenos derivados de patógenos (Falugi et al (2001) *Eur J Immunol* 31; 3816-3824) tales como la proteína N19 (Baraldoi et al (2004) *Infect Immun* 72; 4884-7) proteína de superficie neumococal PspA (documento WO 02/091998), proteínas de recaptación de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761).

Nurkka et al *Pediatric Infectious Enfermedad Journal*. 23(11):1008-14, noviembre de 2004 describe una vacuna neumococal 11-valente con todos los serotipos conjugados a PD. Sin embargo, los autores de la presente invención han mostrado que la actividad opsonofagocítica mejoró para los anticuerpos inducidos con conjugados que tienen 19F conjugado a DT comparado con 19F conjugado a PD. Además, los autores de la presente invención han mostrado que una mayor reactividad cruzada a 19A se ve con 19F conjugado a DT. Por lo tanto es una característica de la composición de la presente invención el hecho de que el serotipo 19F está conjugado a DT o CRM 197. En un aspecto, el serotipo 19F está conjugado a DT. El resto de los serotipos de sacárido de la composición inmunogénica pueden todos estar conjugados a una o más proteínas portadoras que no son DT (es decir, solamente 19F está conjugado a DT), o se pueden dividir entre una o más proteínas portadoras que no son DT y el propio DT. En una realización, 19F está conjugado a DT o CRM 197 y todos los serotipos restantes están conjugados a PD. En otra realización, 19F está conjugado a DT o CRM 197 y los serotipos restantes se dividen entre PD y TT o DT o CRM 197. En otra realización, 19F está conjugado a DT o CRM 197 y no más de un sacárido está conjugado a TT. En un aspecto de esta realización, dicho sacárido es 18C o 12F. En otra realización, 19F está conjugado a DT o CRM 197 y no más de dos sacáridos están conjugados a TT. En otra realización, 19F está conjugado a DT o CRM 197 y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT y DT o CRM 197. En otra realización, 19F está conjugado a DT o CRM 197 y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT y neumolisina. En otra realización, 19F está conjugado a DT o CRM 197 y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT y CRM 197. En otra realización, 19F está conjugado a DT o CRM197 y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT, neumolisina y opcionalmente PhtD o PhtD/la proteína de fusión E. En otra realización, 19F está conjugado a DT o CRM197, 19A está conjugado a neumolisina o TT, uno (dos o tres) otros sacáridos están conjugados a TT, otro sacárido está conjugado a PhtD o PhtD/E y todos los otros sacáridos están conjugados a PD. En otra realización 19F está conjugado a DT o CRM197, 19A está conjugado a neumolisina, uno (dos o tres) otros sacáridos están conjugados a TT, otro sacárido está conjugado a neumolisina, 2 otros sacáridos están conjugados a PhtD o PhtD/E y todos los otros sacáridos están conjugados a PD.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende proteína D de *Haemophilus influenzae*. En esta realización, si PD no es una de las proteínas portadoras usadas para conjugar cualesquiera sacáridos distintos de 19F, por ejemplo 19F está conjugado a DT mientras que los otros serotipos están conjugados a una o más proteínas portadoras diferentes que no son PD, entonces PD estará presente en la composición de vacuna como proteína libre. Si PD es una de las proteínas portadoras usadas para conjugar sacáridos distintos de 19F, luego PD puede opcionalmente estar presente en la composición de vacuna como proteína libre.

El término "sacárido" a lo largo de esta memoria descriptiva puede indicar polisacárido u oligosacárido e incluye ambos. Los polisacáridos se aíslan entre a partir de las bacterias y se pueden dimensionar en algún grado por procedimientos conocidos (véase por ejemplo los documentos EP497524 y EP497525) y preferiblemente por

microfluidización. Los polisacáridos se pueden dimensionar para reducir la viscosidad en las muestras de polisacárido y/o para mejorar la filtrabilidad para productos conjugados. Los oligosacáridos tienen un número de unidades repetidas (típicamente 5-30 unidades repetidas) y son típicamente polisacáridos hidrolizados

5 Los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* comprenden unidades de oligosacárido que se repiten que pueden comprender hasta 8 residuos de azúcar. Para una revisión de las unidades de oligosacárido para los serotipos clave de *Streptococcus pneumoniae* véase JONES, Christopher. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, June 2005, vol.77, n.º 2, p.293-324. ISSN 0001-3765. En una realización, un antígeno de sacárido capsular puede ser un polisacárido de longitud total, sin embargo, en otras puede ser una unidad de oligosacárido, o una más corta que la cadena de sacárido de longitud nativa de unidades de oligosacárido de repetición. En una realización, todos los sacáridos presentes en la vacuna son polisacáridos. Los polisacáridos de longitud total pueden estar "dimensionados" es decir, su dimensión puede reducirse por diversos procedimientos tales como tratamiento de hidrólisis ácida, tratamiento por peróxido de hidrógeno, dimensionamiento por Emulsiflex® seguido de un tratamiento de peróxido de hidrógeno para generar fragmentos de oligosacárido o microfluidización.

15 Los inventores han subrayado también que el interés de la técnica ha sido utilizar oligosacáridos por motivos de facilidad de producción de conjugados. Los inventores han descubierto que usando polisacáridos conjugados nativos o ligeramente dimensionados, una o más de las siguientes ventajas se puede realizar: 1) un conjugado que tiene alta inmunogenicidad que es filtrable, 2) la relación de polisacárido respecto de la proteína en el conjugado se puede alterar de manera que la relación de polisacárido respecto de proteína (p/p) en el conjugado pueda ser mayor (lo que puede tener un efecto sobre el efecto de supresión de portador), 3) los conjugados inmunogénicos propensos a hidrólisis se pueden estabilizar por el uso de mayores sacáridos para la conjugación. El uso de mayores polisacáridos puede dar como resultado más reticulación con el portador del conjugado y puede reducir la liberación de sacárido libre del conjugado. Las vacunas de conjugado descritas en la técnica anterior tienden a despolimerizar los polisacáridos antes de la conjugación para mejorar la conjugación. Los autores de la presente invención han descubierto que las vacunas conjugadas de sacáridos que retienen una mayor dimensión de sacárido pueden proporcionar una buena respuesta inmunitaria contra la enfermedad neumococal.

La composición inmunogénica de la invención puede de este modo comprender uno o más conjugados de sacáridos en los que la dimensión media (por ejemplo peso molecular medio de peso; M_p) de cada sacárido antes de la conjugación es superior a 80 kDa, 100 kDa, 200 kDa, 300 kDa, 400 kDa, 500 kDa o 1000 kDa. En una realización uno o más conjugados de sacárido de la invención deberían tener una dimensión media de preconjugación de sacáridos de 50-1600, 80-1400, 100-1000, 150-500, o 200-400 kDa (obsérvese que donde la dimensión media es M_p , las unidades 'kDa' deberían sustituirse en el presente documento por ' $\times 10^3$ '). En una realización la posconjugación de conjugados debería ser fácilmente filtrable a través de un filtro de 0,2 micrómetros de manera que se obtenga un rendimiento de más del 50, 60, 70, 80, 90 o el 95 % de post-filtración comparado con la muestra de prefiltración.

Para los fines de la invención, "polisacárido nativo" se refiere a un sacárido que no se ha sometido a un proceso (por ejemplo pospurificación), el objeto del cual es reducir la dimensión del sacárido. Un polisacárido puede llegar a reducirse ligeramente en dimensión durante los procedimientos normales de purificación. Un sacárido tal es todavía nativo. Solamente si el polisacárido se ha sometido a técnicas de dimensionamiento, el polisacárido no debería considerarse nativo.

Par los fines de la invención, "dimensionado por un factor hasta $x2$ " significa que el sacárido es sometido a un procedimiento destinado a reducir la dimensión del sacárido pero reteniendo una dimensión de más de la mitad de la dimensión del polisacárido nativo. $X3$, $x4$ etc. han de interpretarse de la misma manera, es decir, el sacárido es sometido a un procedimiento destinado a reducir la dimensión del polisacárido pero reteniendo una dimensión de más de un tercio, un cuarto etc. la dimensión del polisacárido nativo.

En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de al menos 10 serotipos conjugados a la proteína portadora, en la que al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o cada sacárido de *S. pneumoniae* sacárido es un polisacárido nativo.

En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de al menos 10 serotipos conjugados a una proteína portadora, en la que al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o cada sacárido de *S. pneumoniae* está dimensionado por un factor de hasta $x2$, $x3$, $x4$, $x5$, $x6$, $x7$, $x8$, $x9$ o $x10$. En una realización de este aspecto, la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8 o más de los sacáridos están dimensionados por un factor de hasta $x2$, $x3$, $x4$, $x5$, $x6$, $x7$, $x8$, $x9$ o $x10$.

El peso molecular o peso molecular medio (o dimensión) de un sacárido en el presente documento se refiere al peso molecular de peso promedio (M_p) del sacárido medido antes de la conjugación y se mide por la técnica MALLS.

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

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

En una realización, los sacáridos de *S. pneumoniae* están dimensionados por escisión mecánica, por ejemplo por microfluidización o sonicación. La microfluidización y la sonicación tienen la ventaja de reducir la dimensión de los polisacáridos nativos más grandes suficientemente para proporcionar un conjugado filtrable. El dimensionamiento se

lleva a cabo por un factor de no más de x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3 o x2.

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

En una realización el sacárido de *Streptococcus pneumoniae* está conjugado a la proteína portadora por un ligador, por ejemplo un ligador a bifuncional. El ligador es opcionalmente heterobifuncional u homobifuncional, teniendo por ejemplo un grupo amino reactivo y un grupo ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amino reactivos o dos grupos ácido carboxílico reactivos. El ligador tiene por ejemplo entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un posible ligador es ADH. Otros ligadores incluyen B-propionamido (documento WO 00/10599), nitrofeniletilamina (Gevert et al (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), haluros de haloalquilo (documento US4057685), ligamientos glucosídicos (documentos US4673574, US4808700), diamina de hexano y ácido 6-aminocaproico (documento US4459286). En una realización, ADH se usa como un ligador para conjugar sacárido de serotipo 18C. En una realización, ADH se usa como un ligador para conjugar sacárido de serotipo 22F.

Los conjugados de sacárido presentes en la composición inmunogénica de la invención se pueden preparar por cualquier técnica de acoplamiento. El procedimiento de conjugación puede contar con la activación del sacárido con 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato (CDAP) para formar un éster de cianato. El sacárido activado se puede de este modo acoplar directamente o por un grupo espaciador (ligador) a un grupo amino sobre la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para proporcionar un polisacárido tiolado que podría acoplarse al portador por un ligamiento tioéter obtenido después de la reacción con una proteína portadora activada por maleimida (por ejemplo usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo usando yodoacetimida [por ejemplo etilyodoacetimida HCl] o N-succinimidil bromoacetato o SIAB, o SIA, o SBAP). Preferiblemente, el éster de cianato (opcionalmente realizado por química de CDAP) se acopla con diamina de hexano o ADH y el sacárido amino-derivatizado está conjugado a la proteína portadora usando química de carbodiimidias (por ejemplo EDAC o EDC) por un grupo carboxilo sobre el portador proteico. Tales conjugados se describen en la solicitud PCT publicada del documento WO 93/15760 Uniformed Services University y los documentos WO 95/08348 y WO 96/29094.

Otras técnicas utilizan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU. Muchos se describen en el documento WO 98/42721. La conjugación puede implicar un ligador carbonilo que se puede formar por reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (Bethell et al J. Biol. Chem. 1979, 254; 2572-4, Hearn et al J. Chromatogr. 1981, 218; 509-18) seguido de la reacción de una proteína para formar un ligamiento de carbamato. Esto puede implicar la reducción del termino anomérico a un grupo hidroxilo primario, protección/desprotección opcional de la reacción de grupo hidroxilo primario del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermedio de carbamato CDI y acoplar el intermedio de carbamato CDI con un grupo amino sobre una proteína.

Los conjugados se pueden preparar por procedimientos de aminación reductora directa como se describen en los documentos US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). Otros procedimientos se describen en los documentos EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508.

Otro procedimiento implica el acoplamiento de un sacárido activado por bromuro de cianógeno (o CDAP) derivatizado con dihidrazida de ácido adipico (ADH) al portador proteico por condensación de carboimido (Chu C. et al Infect. Immunity, 1983 245 256), por ejemplo usando EDAC.

En una realización, un grupo hidroxilo (preferiblemente un grupo hidroxilo activado, por ejemplo un grupo hidroxilo activado para realizar un éster de cianato [por ejemplo con CDAP]) sobre un sacárido está ligado a un grupo amino o carboxílico sobre una proteína bien directa o bien indirectamente (a través de un ligador). Donde un ligador está presente, un grupo hidroxilo sobre un sacárido está preferiblemente ligado a un grupo amino sobre un ligador, por ejemplo usando conjugación de CDAP. Otro grupo amino en el ligador (por ejemplo ADH) puede estar conjugado a un grupo ácido carboxílico sobre una proteína, por ejemplo usando química de carbodiimido, por ejemplo usando EDAC. En una realización, el/los sacárido(s) capsular(es) neumococal(es) se conjuga(n) al ligador primero antes de que el ligador esté conjugado a la proteína portadora. Alternativamente el ligador se puede conjugar al portador antes de la conjugación al sacárido.

Una combinación de técnicas también se puede usar, con algunos conjugados de sacárido-proteína preparados por CDAP y algunos por aminación reductora.

En general los siguientes tipos de grupos químicos sobre un portador proteico se pueden usar para acoplamiento/conjugación:

A) Carboxilo (por ejemplo por ácido aspártico o ácido glutámico). En una realización este grupo está ligado a grupos amino sobre sacáridos directamente a un grupo amino sobre un ligador con química de carbodiimido y por ejemplo con EDAC.

B) Grupo amino (por ejemplo por lisina). En una realización este grupo se liga a grupos carboxilo sobre sacáridos directamente o a un grupo carboxilo sobre un ligador con química de carbodiimidias por ejemplo con EDAC. En otra realización este grupo está ligado a grupos hidroxilo activados con CDAP o CNBr sobre sacáridos directamente o a tales grupos sobre un ligador; a sacáridos o a ligadores que tienen un grupo aldehído; a sacáridos o a ligadores que tienen un grupo éster de succinimida.

C) Sulfhidrilo (por ejemplo por cisteína). En una realización este grupo está ligado a sacárido acetilado de bromo o de cloro o a ligador con química de maleimido. En una realización este grupo se activa/modifica con bis diazobenzidina.

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

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

5 F) Grupo guanidilo (por ejemplo por arginina).

G) Grupo indolilo (por ejemplo por triptofano).

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

10 **Enfoques de acoplamiento directo:**

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

Enfoques de acoplamiento indirecto por espaciador (ligador):

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

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

20 Sacárido-OH + CNBr o CDAP ---> éster de cianato + NH₂---SH ----> sacárido---SH + maleimido-Prot (modificación de grupos aminos) ----> conjugado

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

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

25 Sacárido-COOH + EDAC+ NH₂---SH ----> sacárido---SH + SH-Prot (proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida después de modificación de los grupos amino de la proteína por SPDP por ejemplo) ----> sacárido-S-S-Prot

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

30 Sacárido-COOH + EDAC + NH₂---SH ---> Sacárido-SH + Prot haloacetilado ----> Conjugado

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

Nota: en lugar del EDAC anterior, se puede usar cualquier carbodiimido apropiado.

35 En resumen, los tipos de grupo químico de portador proteico que se pueden usar generalmente para acoplarse a un sacárido son grupos amino (por ejemplo sobre residuos de lisina), grupos COOH (por ejemplo sobre residuos ácido de aspártico y glutámico) y grupos SH (si son accesibles) por ejemplo sobre residuos de cisteína.

Preferiblemente la relación de proteína portadora respecto del sacárido de *S. pneumoniae* está entre 1:5 y 5:1; por ejemplo entre 1:0,5-4:1, 1:1-3,5:1, 1,2:1-3:1, 1,5:1-2,5:1; por ejemplo entre 1:2 y 2,5:1; 1:1 y 2:1 (p/p). En una realización, la mayoría de los conjugados, por ejemplo 6, 7, 8, 9 o más de los conjugados tienen una relación de proteína portadora respecto del sacárido que es mayor que 1:1, por ejemplo 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1 o 1,6:1.

40 En una realización, al menos un sacárido de *S. pneumoniae* está conjugado a la proteína portadora por un ligador usando CDAP y EDAC. Por ejemplo, 18C o 22F se pueden conjugar a una proteína por un ligador (por ejemplo los que tienen dos grupos hidracina en sus extremos tales como ADH) usando CDAP y EDAC como se ha descrito anteriormente. Cuando se usa un ligador, se puede usar CDAP para conjugar el sacárido a un ligador y se pueden usar entonces EDAC para conjugar el ligador a una proteína o, alternativamente se puede usar EDAC en primer lugar para conjugar el ligador a la proteína, después de lo que se puede usar CDAP para conjugar el ligador al sacárido.

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

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

composición inmunogénica están presentes a una dosis de aproximada o exactamente 1 µg.

“Alrededor de” o “aproximadamente” están definidos dentro del 10 % más o menos de la figura dada para los fines de la invención.

5 En una realización, al menos uno de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* está directamente conjugado a una proteína portadora (por ejemplo usando una de las químicas anteriormente descritas). Preferiblemente el al menos uno los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* está directamente conjugado por CDAP. En una realización, la mayoría de los sacáridos capsulares por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9 o más están directamente ligados a la proteína portadora por CDAP (véanse los documentos WO 95/08348 y WO 96/29094).

10 La composición inmunogénica puede comprender proteínas de *Streptococcus pneumoniae*, denominadas en el presente documento proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la invención. Tales proteínas se pueden usar como proteínas portadoras, o pueden estar presentes como proteínas libres, o pueden estar presentes como proteínas portadoras y como proteínas libres. Las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la invención están bien expuestas en superficie, al menos durante una parte del ciclo de vida del neumococo, o bien son proteínas que son secretadas o liberadas por el neumococo. Preferiblemente las proteínas de la invención se seleccionan a partir de las siguientes categorías, tales como proteínas que tienen un resto de LXXC de secuencia de señal de tipo II (donde X es cualquier aminoácido, por ejemplo, la familia de tríada de polihistidina (PhtX)), proteínas de unión a colina (CbpX), proteínas que tienen un resto de secuencia de señal de tipo I (por ejemplo, Sp101), proteínas que tienen un resto LPXTG (donde X es un aminoácido, por ejemplo, Sp128, Sp130) y toxinas (por ejemplo, Ply). Los ejemplos preferidos en estas categorías (o restos) son las siguientes proteínas, o sus equivalentes inmunológicamente funcionales.

15 En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende al menos 1 proteína seleccionada del grupo que consiste en la familia de tríada de polihistidina (PhtX), la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, la familia LytX, truncados de LytX, proteínas químicas de truncados de CbpX-truncados de LytX (o fusiones), neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133. En otra realización, la composición inmunogénica comprende 2 o más proteínas seleccionadas del grupo constituido por la familia de tríada de polihistidina (PhtX), la familia de proteína de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, truncados de LytX, proteínas químicas (o fusiones) de truncados de CbpX-truncados de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA y Sp128. En otra realización, la composición inmunogénica comprende 2 o más proteínas seleccionadas en el grupo que consiste en la familia de tríada de polihistidina (PhtX), la familia de proteína de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, truncados de LytX, proteínas químicas (o fusiones) de truncados de CbpX-truncados de LytX, neumolisina (Ply) y Sp128.

25 La familia Pht (tríada de polihistidina) comprende proteínas PhtA, PhtB, PhtD y PhtE. La familia se caracteriza por una secuencia de lipidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y diversas tríadas de histidina, posiblemente implicadas actividad de unión a metal o a nucleósido o enzimática, regiones enrolladas en espiral (3-5), un extremo N-terminal conservado y un extremo C-terminal heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos ensayadas. Las proteínas homólogas también se han encontrado en otros estreptococos y en *Neisseria*. En una realización de la invención, la proteína Pht de la invención es PhtD. Se entiende, sin embargo, que los términos Pht A, B, D y E se refieren a proteínas que tienen secuencias divulgadas en las citaciones de más adelante así como sus variantes que se dan en la naturaleza (y hechas por el hombre) que tienen una homología de secuencias que es al menos el 90 % idéntica a las proteínas referenciadas. Preferiblemente al menos el 95 % es idéntica y más preferiblemente el 97 % es idéntica.

30 Respecto de las proteínas PhtX, se divulga PhtA en el documento WO 98/18930 y se refiere también a Sp36. Como se ha indicado anteriormente, es una proteína de la familia de la tríada de polihistidina y tiene el resto de señal de tipo II de LXXC. PhtD se divulga en el documento WO 00/37105 y se refiere también a Sp036D. Como se ha indicado anteriormente, también es una proteína de la familia de tríada de polihistidina y tiene el resto señal LXXC de tipo II. PhtB se divulga en el documento WO 00/37105 y se refiere también a Sp036B. Otro miembro de la familia PhtB es el polipéptido de degradación de C3, descrito en el documento WO 00/17370. Esta proteína también es de la familia de la tríada de polihistidina y tiene el resto señal LXXC de tipo II. Un equivalente funcional inmunológicamente preferido es la proteína Sp42 divulgada en el documento WO 98/18930. Un truncado de PhtB (aproximadamente 79kD) se divulga en el documento WO99/15675 que se considera también un miembro de la familia PhtX. PhtE se divulga en el documento WO00/30299 y se denomina BVH-3. Donde en el presente documento se hace referencia a cualquier proteína Pht, esto significa que los fragmentos inmunogénicos o las fusiones de los mismos de la proteína Pht se pueden usar. Por ejemplo, una referencia a PhtX incluye fragmentos inmunogénicos o las fusiones de los mismos de cualquier proteína Pht. Una referencia a PhtD o PhtB es también una referencia a PhtDE o a las fusiones de PhtBE encontradas por ejemplo en el documento WO0198334.

35 La neumolisina es una toxina multifuncional con distintas actividades de activación citolítica (hemolítica) y de complemento (Rubins et al., Am. Respi. Cit Care Med, 153:1339-1346 (1996)). La toxina no es secretada por neumococos, sino que es liberada por lisis de neumococos sometidos a la influencia de la autolisina. Sus efectos incluyen por ejemplo, la estimulación de la producción de citocinas inflamatorias por monocitos humanos, la inhibición del movimiento de los cilios en el epitelio respiratorio humano y la reducción de la actividad bactericida y la migración de neutrófilos. El efecto más evidente de la neumolisina está en la lisis de glóbulos rojos, que implica la unión a colesterol. Debido al hecho de que es una toxina, no necesita detoxificarse (es decir, no es tóxica para un ser humano cuando se proporciona a una dosificación apropiada para protección) antes de que pueda administrarse in vivo. La expresión de la clonación de neumolisina silvestre o nativa se conoce en la técnica. Véanse, por ejemplo, Walker et al. (Infect Immun, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell et al. (Biochim Biophys Acta, 1007:67-72 (1989) y Mitchell et al. (NAR, 18:4010 (1990)). La detoxificación de Ply se puede llevar a cabo por medios químicos, por ejemplo, sometiendo a tratamiento de formalino o glutaraldehído o a una combinación de ambos (documentos WO 04081515, PCT/EP2005/010258). Tales procedimientos se conocen bien en la técnica para diversas toxinas. Alternativamente, Ply puede detoxificarse genéticamente. De este modo, la invención comprende derivados de

proteínas neumococales que pueden ser, por ejemplo, proteínas mutadas. El término “mutado” se usa en el presente documento para querer decir una molécula que ha experimentado delección, adición o sustitución de uno o más aminoácidos usando técnicas bien conocidas para mutagénesis dirigida de sitios o cualquier otro procedimiento convencional. Por ejemplo, como se describe anteriormente, una proteína Ply mutante puede alterarse de manera que está biológicamente inactiva mientras mantiene aún sus epitopes inmunogénicos, véanse por ejemplo, el documento WO90/06951, Berry et al. (Infect Immun, 67:981-985 (1999)) y el documento WO99/03884.

Tal como se usa en el presente documento, el término “Ply” se refiere a neumolisina mutada o detoxificada apropiada para uso médico (es decir, no tóxica).

Respecto de la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), los miembros de esta familia se identificaron originariamente como proteínas neumococales que podrían purificarse por cromatografía por afinidad de colina. Todas las proteínas de unión a colina están unidas no covalentemente a residuos de fosforilcolina de ácido teicoico de pared celular y ácido lipoteicoico asociado a membrana. Estructuralmente, tienen diversas regiones en común en toda la familia, aunque la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia de aminoácidos, longitud, etc.) puede variar. En general, las proteínas de unión a colina comprenden una región N-terminal (N), regiones repetidas conservadas (R1 y/o R2), una región rica en prolina (P) y una región de unión a colina conservada (C), constituida por múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente una mitad de la proteína. Tal como se usa en la solicitud, el término “familia de proteínas de unión a colina (CbpX)” se selecciona del grupo constituido por las proteínas de unión a colina según se identifican en el documento WO97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD y CbpG. CbpA se divulga en el documento WO97/41151. CbpD y CbpG se divulgan en el documento WO00/29434. PspC se divulga en el documento WO97/09994. PbcA se divulga en el documento WO98/21337. SpsA es una proteína de unión a colina divulgada en el documento WO 98/39450. Preferiblemente las proteínas de unión a colina se seleccionan del grupo constituido por CbpA, PbcA, SpsA y PspC.

Otra realización preferida es los truncados de CbpX en la que “CbpX” se define anteriormente y “truncados” se refiere a las proteínas CbpX que carecen del 50 % o más de la región (C) de unión a colina. Preferiblemente tales proteínas carecen de la región entera de unión a colina. Más preferiblemente, tales truncados de proteínas carecen de (i) la región de unión a colina y (ii) una porción de la mitad N-terminal de la proteína también, aunque retienen al menos una región repetida (R1 o R2). Más preferiblemente aún, el truncado tiene 2 regiones repetidas (R1 y R2). Ejemplos de tales realizaciones son NR1xR2 y R1xR2 como se ilustra en los documentos WO99/51266 o WO99/51188, sin embargo, se contemplan también otras proteínas de unión a colina que carecen de una región de unión a colina similar dentro del alcance de esta invención.

La familia LytX son proteínas asociadas a membrana asociadas con lisis celular. El dominio de terminal N comprende dominio(s) de unión a colina, sin embargo la familia LytX no tiene todas las características encontradas en la familia CbpA indicada anteriormente y de este modo para la presente invención, la familia LytX se considera distinta de la familia CbpX. En contraste con la familia CbpX, el dominio C-terminal contiene el dominio catalítico de la familia de las proteínas LytX. La familia comprende LytX, B y C. Respecto de la familia LytX, LytA se divulga en Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). LytB se divulga en el documento WO 98/18930 y se denomina también Sp46. LytC se divulga también en el documento WO 98/18930 y se denomina también Sp91. Un miembro preferido de esta familia es LytC.

Otra realización preferida son los truncados de LytX en los que “LytX” se define anteriormente y “truncados” se refiere a las proteínas LytX que carecen del 50 % o más de la región de unión a colina. Preferiblemente tales proteínas carecen de toda la región de unión a colina. Aún otra realización preferida de la invención son las proteínas quiméricas (o fusiones) de truncado CbpX-truncado LytX. Preferiblemente este comprende NR1xR2 (o R1xR2) de CbpX y la porción C-terminal (Cterm, es decir, que carece de los dominios de unión a colina) de LytX (por ejemplo, Cterm de LytC o Cterm de Sp91). Más preferiblemente CbpX se selecciona a partir del grupo que consiste en CbpA, PbcA, SpsA y PspC. Más preferiblemente, es CbpA. Preferiblemente, LytX es LytC (también denominada Sp91). Otra realización de la presente invención es un PspA o truncados de PsaA que carecen del dominio (C) de unión a colina y se expresan como una proteína de fusión con LytX. Preferiblemente, LytX es LytC.

Respecto de saA y PspA, ambas se conocen en la técnica. Por ejemplo, PsaA y sus variantes de delección de transmembrana se han descrito por Berry & Paton, Infect Immun diciembre de 1996; 64(12):5255-62. PspA y sus variantes de delección de transmembrana se han divulgado en, por ejemplo, los documentos US 5804193, WO 92/14488 y WO 99/53940.

Sp128 y Sp130 se divulgan en el documento WO00/76540. Sp125 es un ejemplo de una proteína de superficie neumococal con el resto anclado de pared celular de LPXTG (donde X es cualquier aminoácido). Cualquier proteína en esta clase de proteína de superficie neumococal con este resto se ha encontrado que es útil en el contexto de esta invención y por lo tanto se considera una proteína más de la invención. La propia Sp125 se divulga en el documento WO 98/18930 y se conoce también como ZmpB —una metaloproteinasas de zinc. Sp101 se divulga en el documento WO 98/06734 (donde tiene la referencia # y85993). Se caracteriza por una secuencia de señal de tipo I. Sp133 se divulga en el documento WO 98/06734 (donde tiene la referencia # y85992). Se caracteriza también por una secuencia señal de tipo I.

Ejemplos de antígenos preferidos proteína de *Moraxella catarrhalis* que pueden incluirse en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de la otitis media) son: OMP106 [documentos WO 97/41731 (Antex) y WO 96/34960 (PMC)]; OMP21 o sus fragmentos (documento WO 0018910); LbpA y/o LbpB [documento WO 98/55606 (PMC)]; TbpA y/o TbpB [documentos WO 97/13785 y WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, et al. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [documento WO 93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR (documento PCT/EP99/03824); PilQ (documento PCT/EP99/03823); OMP85 (documento PCT/EP00/01468); lipo06 (documento GB 9917977.2); lipo10 (documento GB 9918208.1); lipo11 (documento GB 9918302.2); lipo18 (documento GB 9918038.2); P6 (documento PCT/EP99/03038); D15 (documento PCT/EP99/03822); OmpIA1 (documento PCT/EP99/06781); Hly3 (documento PCT/EP99/03257); y OmpE. Ejemplos de antígenos no tipificables

de *Haemophilus influenzae* o sus fragmentos que pueden estar incluidos en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de otitis media) incluyen: proteína de fibrina [(documento US 5766608 -Ohio State Research Foundation)] y fusiones que comprenden péptidos de la misma [por ejemplo fusiones peptídicas LB1(f); documento US 5843464 (OSU) o documento WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (Universidad Estatal de Nueva York)]; TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (documento WO 94/12641); P2; y P5 (documento WO 94/26304).

Las proteínas de la invención también se pueden combinar beneficiosamente. Por combinadas se entiende que la composición inmunogénica comprende todas las proteínas del interior de las siguientes combinaciones, bien como proteínas portadoras o bien como proteínas libres o bien como una mezcla de las dos. Por ejemplo, en una combinación de dos proteínas como se ha expuesto más adelante, ambas proteínas se pueden usar como proteínas portadoras, o ambas proteínas pueden estar presentes como proteínas libres, o ambas pueden estar presentes como proteínas portadoras y como proteínas libres, o una puede estar presente como una proteína portadora y una proteína libre mientras que la otra está presente solamente como una proteína portadora o solamente como una proteína libre, o una puede estar presente como una proteína portadora y la otra como una proteína libre. Donde se da una combinación de tres proteínas, existen posibilidades similares. Las combinaciones preferidas, incluyen, pero no se limitan a, proteínas de quiméricas o de fusión PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Cterm de Sp91, proteínas de quiméricas o de fusión PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2-Cterm de Sp91, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Preferiblemente, NR1xR2 (o R1xR2) es de CbpA o PspC. Más preferiblemente es de CbpA. Otras combinaciones incluyen 3 combinaciones de proteínas tales como PhtD + NR1xR2 + Ply y PhtA + NR1xR2 + PhtD. En una realización, la composición de vacuna comprende neumolisina detoxificada y PhtD o PhtDE como proteínas portadoras. En otra realización, la composición de vacuna comprende neumolisina detoxificada y PhtD o PhtDE como proteínas libres.

La presente invención proporciona además una vacuna que contiene la composición inmunogénica de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las vacunas de la presente invención pueden estar adyuvada particularmente cuando están destinadas a usarse en una población anciana pero también para su uso en poblaciones infantiles. Los adyuvantes apropiados incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o alumbre, pero también pueden ser una sal de calcio, magnesio, hierro o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, sacáridos catiónicamente o aniónicamente derivatizados, o polifosfacenos.

Se prefiere que el adyuvante sea seleccionado por ser un inductor preferente de un tipo de respuesta TH1. Tales niveles elevados de citocinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células a un antígeno dado, mientras que los niveles elevados de citocinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales al antígeno.

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

Un sistema mejorado implica la combinación de un lípido A de monofosforilo y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se divulga en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica donde QS21 se inactiva con colesterol como se divulga en el documento WO 96/33739. Una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210. En una realización la composición inmunogénica comprende además una saponina, que puede ser QS21. La formulación puede también comprender una emulsión de aceite en agua y tocoferol (documento WO 95/17210). Los oligonucleótidos que contienen CpG no metilado (documento WO 96/02555) y otros oligonucleótidos inmunomoduladores (documentos WO0226757 y WO03507822) son también inductores preferenciales de una respuesta TH1 y son apropiados para su uso en la presente invención.

Los adyuvantes particulares son los seleccionados a partir del grupo de sales metálicas, emulsiones de aceite en agua, agonista de receptores de tipo Toll, (en particular agonista de receptor 2 de tipo Toll, agonista de receptor 3 de tipo Toll, agonista de receptor 4 de tipo Toll, agonista de receptor 7 de tipo Toll, agonista de receptor 8 de tipo Toll y agonista de receptor 9 de tipo Toll), saponinas o sus combinaciones.

Un adyuvante que se puede usar con las composiciones de vacunas de la invención son preparaciones de ampollas o preparaciones de vesículas de membranas exteriores de cepas bacterianas Gram negativas tales como las

enseñadas por el documento WO02/09746 –particularmente ampollas de *N. meningitidis*. Las propiedades adyuvantes de ampollas se pueden mejorar reteniendo LOS (lipooligosacárido) en su superficie (por ejemplo a través de la extracción con concentraciones bajas de detergente [por ejemplo 0-0,1 % de desoxicolato]). LOS se puede detoxificar a través de las mutaciones msbB(-) o htrB(-) tratadas en el documento WO02/09746. Las propiedades adyuvantes también pueden mejorarse reteniendo PorB (y opcionalmente retirando PorA) de ampollas meningococales. Las propiedades adyuvantes también pueden mejorarse truncando la estructura de sacárido del núcleo exterior de LOS sobre ampollas meningococales –por ejemplo por medio de la mutación lgtB(-) tratada en el documento WO2004/014417. Alternativamente, el LOS anteriormente mencionado (por ejemplo aislado de una cepa de msbB(-) y/o lgtB(-)) se puede purificar y usar como un adyuvante en las composiciones de la invención.

Otro adyuvante que se puede usar con las composiciones de la invención puede seleccionarse a partir del grupo: una saponina, lípido A o un derivado del mismo, un oligonucleótido inmunoestimulador, un fosfato alquilglucosamínido, una emulsión de aceite en agua o una combinación de los mismos. Otro adyuvante preferido es una sal metálica en combinación con otro adyuvante. Se prefiere que el adyuvante sea un agonista de receptor de tipo Toll en particular un agonista de un receptor de tipo Toll 2, 3, 4, 7, 8 o 9, o una saponina, en particular Qs21. Se prefiere además que el sistema de adyuvante comprenda dos o más adyuvantes de la lista anterior. En particular las combinaciones contienen preferiblemente una saponina (en particular Qs21) adyuvante y/o un agonista de receptor 9 de tipo Toll tal como un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG. Otras combinaciones comprenden una saponina (en particular QS21) y un agonista de receptor 4 de tipo Toll tal como lípido A de monofosforilo o su derivado 3 desacilado, 3D-MPL, o una saponina (en particular QS21) y un ligando de receptor 4 de tipo Toll tal como fosfato alquilglucosamínido.

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

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

3D-MPL está disponible en GlaxoSmithKline Biologicals North America y promueve principalmente respuestas de células T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). Se puede producir según los procedimientos divulgados en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de lípido A de 3-monofosforilo desacetilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas acetiladas. Preferiblemente en las composiciones de la presente invención se usa 3D-MPL en pequeñas partículas. 3D-MPL en pequeñas partículas tiene una dimensión de partícula tal que puede filtrarse en modo estéril a través de un filtro de 0,22 µm. Tales preparaciones se divulgan en los documentos de publicación de patente internacional N.º: WO 94/21292. Los derivados sintéticos de lípido A se conocen y enseñan a ser agonistas de TLR4, incluyendo, pero no limitados a:

OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (documento WO 95/14026)

OM 294 DP (3S, 9R)-3--[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (documentos WO99 /64301 y WO 00/0462)

OM 197 MP-Ac DP (3S-, 9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (documento WO 01/46127).

Otros ligandos TLR4 que se pueden usar son fosfatos alquil glucosaminídeos (AGP) tales como los descritos en los documentos WO9850399 o US6303347 (también se divulgan procedimientos para preparar AGP), o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se divulgan en el documento US6764840. Algunos AGP son agonistas de TLR4 y algunos AGP son antagonistas de TLR4. Se piensa que ambos son útiles como adyuvantes.

Otro inmunoestimulante preferido para su uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponinas aislada del árbol Quillaja Saponaria Molina de Sudamérica y se describió en primer lugar como teniendo actividad adyuvante por Dalsgaard et al. en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlín, p. 243-254). Se han aislado fragmentos purificados de Quil A por HPLC que retienen la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural derivado de la corteza de Quillaja saponaria Molina que induce células T citotóxicas CD8+ (CTL), células Th1 y una respuesta de anticuerpo IgG2 predominante y es una saponina preferida en el contexto de la presente invención.

Se han descrito formulaciones particulares de QS21 que se prefieren particularmente, estas formulaciones comprenden además un esteroles (documento WO96/33739). Las saponinas que forman parte de la presente invención se pueden separar en forma de micelas, micelas mezcladas (preferiblemente, pero no exclusivamente con sales biliares) o pueden estar en forma de matrices ISCOM (documento EP 0 109 942 B1), liposomas o estructuras coloidales relacionadas tales como complejos multiméricos vermiformes o anulares o estructuras lipídicas/multicapa y láminas cuando se formulan con colesterol y lípido, o en forma de una emulsión de aceite en agua (por ejemplo como en el documento WO 95/17210). Las saponinas se pueden asociar preferiblemente con una sal metálica, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (documento WO 98/15287).

Preferiblemente, la saponina se presenta en forma de un liposoma, ISCOM o una emulsión de aceite en agua.

Un sistema potenciado implica la combinación de un lípido A monofosforilo (o lípido A detoxificado A) y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL descrita en el documento WO 94/00153, o una

composición menos reactogénica donde el QS21 se inactiva con colesterol como se divulga en el documento WO 96/33739. Una formulación adyuvante particularmente potente que comprende tocoferol con o sin QS21 y/o 3D-MPL en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210. En una realización la composición inmunogénica comprende además una saponina, que puede ser QS21.

5 Los oligonucleótidos inmunoestimuladores o cualquier otro agonista de receptor (TLR) 9 de tipo Toll también se pueden usar. Los oligonucleótidos preferidos para su uso en adyuvantes o vacunas de la presente invención son oligonucleótidos que contienen CpG, preferiblemente que contienen dos o más restos CpG de dinucleótido separados por al menos tres, más preferiblemente al menos seis o más nucleótidos. Un resto CpG es un nucleótido de Citosina seguido por un nucleótido de Guanina. Los oligonucleótidos CpG de la presente invención son típicamente desoxinucleótidos. En una realización preferida el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace fosforotioato, aunque los enlaces fosfodiéster y otros enlaces internucleótidos están dentro del alcance de la invención. También se incluyen dentro del alcance de la invención los oligonucleótidos con ligamientos de internucleótidos mezclados. Los procedimientos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en los documentos US5.666.153, US5.278.302 y WO95/26204.

15 Los ejemplos de oligonucleótidos preferidos tienen la siguiente secuencia. Las secuencias contienen preferiblemente ligamientos de internucleótidos modificados de fosforotioato.

OLIGO 1 (SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3 (SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

20 OLIGO 4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

OLIGO 6 (SEQ ID NO:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)

Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias preferidas anteriores en las que hay deleciones o adiciones sin consecuencias.

25 Los oligonucleótidos CpG utilizados en la presente invención pueden sintetizarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo véase el documento EP 468520). Convenientemente, tales oligonucleótidos pueden sintetizarse utilizando un sintetizador automático.

El adyuvante puede ser una emulsión de aceite en agua o puede comprender una emulsión de aceite en agua en combinación con otros adyuvantes. La fase de aceite del sistema de emulsión comprende preferiblemente un aceite metabolizable. El significado del término metabolizable se conoce bien en la técnica. Metabolizable se puede definir como "que es capaz de transformarse por metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no es tóxico para el receptor y es capaz de transformarse por metabolismo. Las nueces, semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos son también parte de esta invención y pueden incluir aceites comercialmente disponibles tales como NEOBEE® y otros. El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón y en menores cantidades en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz y levadura y es un aceite particularmente preferido para su uso en esta invención. El escualeno es un aceite metabolizable gracias al hecho de que es un intermedio en la biosíntesis de colesterol (Merck index, 10ª edición, entrada n.º: 8619). Los tocoles (por ejemplo vitamina E) se usan a menudo en adyuvantes de emulsiones de aceites (documentos EP 0 382 271 B1; US5667784; WO 95/17210). Los tocoles usados en las emulsiones de aceite (preferiblemente emulsiones de aceite en agua) de la invención se pueden formular como se describe en el documento EP 0 382 271 B1, porque los tocoles pueden ser dispersiones de gotas de tocol, que comprenden opcionalmente un emulsionante, preferiblemente inferior a 1 micrómetro de diámetro. Alternativamente, los tocoles se pueden usar en combinación con otro aceite, para formar la fase de aceite de una emulsión de aceite. Los ejemplos de emulsiones de aceite que se pueden usar en combinación con el tocol se describen en el presente documento, tales como los aceites metabolizables descritos anteriormente.

Se ha sugerido que los adyuvantes de emulsiones de aceite en agua en sí son útiles como composiciones adyuvantes (documento EP 0 399 843B), también combinaciones de emulsiones de aceite en agua y otros agentes se han descrito como adyuvantes para vacunas (documentos WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Se han descrito otros adyuvantes de emulsión de aceite, tales como emulsiones de agua en aceite (documentos US 5,422,109; EP 0 480 982 B2) y emulsiones de agua en aceite en agua (documentos US 5,424,067; EP 0 480 981 B). Todos los cuales forman sistemas de emulsiones de aceite preferidos (en particular cuando se incorporan tocoles) para formar adyuvantes y composiciones de la presente invención.

55 Más preferiblemente la emulsión de aceite (por ejemplo emulsión de agua en aceite) comprende además un emulsionante tal como TWEEN 80 y/o un esteroil tal como el colesterol.

Una emulsión de aceite (preferiblemente emulsiones de aceite en agua) comprende un aceite no tóxico, metabolizable, tal como escualano, escualeno o un tocoferol tal como alfatocoferol (y preferiblemente tanto escualeno como alfatocoferol) y opcionalmente un emulsionante (o tensioactivo) tal como Tween 80. Un esteroil (preferiblemente colesterol) también puede estar incluido.

El procedimiento para producir emulsiones de aceite en agua se conoce bien por el experto en la técnica. Comúnmente, el procedimiento comprende mezclar la fase de aceite que contiene tocol con un tensioactivo tal como

una solución PBS/TWEEN80™, seguido por la homogeneización usando un homogeneizador, sería evidente para un experto en la técnica que un procedimiento que comprende hacer pasar la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringa sería apropiado para homogeneizar pequeños volúmenes de líquido. Igualmente, el procedimiento de emulsificación en el microfluidizador (M110S Microfluidics machine, máximo de 50 pasadas para un periodo de 2 minutos a entrada de máxima presión de 6 bares (presión de salida de aproximadamente 850 bares)) podría adaptarse por el experto en la técnica para producir mayores o menores volúmenes de emulsión. La adaptación podría llevarse a cabo por experimentación de rutina que comprende la medición de la emulsión resultante hasta que se consigue una preparación con gotas de aceite del diámetro requerido. En una emulsión de aceite en agua, el aceite y emulsionante debería estar en un portador acuoso. El portador acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina de tampón fosfato.

La dimensión de las gotas de aceite que se encuentran dentro de la emulsión de aceite en agua es preferiblemente inferior a 1 micrómetro, pueden estar en el intervalo de sustancialmente 30-600 nm, preferiblemente sustancialmente alrededor de 30-500 nm de diámetro y lo más preferiblemente sustancialmente 150-500 nm de diámetro y en particular aproximadamente 150 nm de diámetro medidos por espectroscopia de correlación de fotones. A este respecto, el 80 % de las gotas de aceite en número deberían estar dentro de los intervalos preferidos, más preferiblemente más del 90 % y más preferiblemente más del 95 % de las gotas de aceite en número están dentro de los intervalos de dimensión definidos. Las cantidades de los componentes presentes en las emulsiones de aceite de la presente invención están convenientemente en el intervalo del 0,5-20 % o del 2 al 10 % de aceite (del volumen de dosis total), tal como el escualeno; y cuando está presente, del 2 al 10 % de alfatocoferol; y del 0,3 al 3 % de tensioactivo, tal como polioxietileno sorbitán monooleato. Preferiblemente la relación de aceite (preferiblemente escualeno):tocol (preferiblemente α -tocoferol) es igual o inferior a 1 puesto que esto proporciona una emulsión más estable. Un emulsionante, tal como Tween 80 o Span 85 también puede estar presente a un nivel de aproximadamente el 1 %. En algunos casos, puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan además un estabilizante.

Los ejemplos preferidos de sistemas de emulsión se describen en los documentos WO 95/17210, WO 99/11241 y WO 99/12565 que describen adyuvantes de emulsión basados en escualeno, α -tocoferol y TWEEN 80, opcionalmente formulados con los inmunoestimulantes QS21 y/o 3D-MPL. De este modo en una realización preferida, particularmente, de la presente invención, el adyuvante de la invención puede comprender otros inmunoestimulantes, tales como LPS o derivados del mismo, y/o saponinas. Los ejemplos de otros inmunoestimulantes se describen en el presente documento y en "Vaccine Design—The Subunit and Adyuvante Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, volumen 6, Eds. Powell, M.F. y Newman, M.J., Plenum Press, Nueva York y Londres, ISBN 0-306-44867-X.

En un aspecto preferido las composiciones adyuvantes e inmunogénicas según la invención comprenden una saponina (preferiblemente QS21) y/o un derivado LPS (preferiblemente 3D-MPL) en una emulsión de aceite anteriormente descrita, opcionalmente con un esteroles (preferiblemente colesterol). Adicionalmente la emulsión de aceite (preferiblemente emulsión de aceite en agua) puede contener span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina. Los adyuvantes que comprende emulsión de aceite en agua, un esteroles y una saponina son descritos en el documento WO 99/12565.

Típicamente para la administración humana la saponina (preferiblemente QS21) y/o el derivado LPS (preferiblemente 3D-MPL) estarán presentes en una dosis humana de composición inmunogénica en el intervalo de 1 μ g–200 μ g, tal como 10-100 μ g, preferiblemente 10 μ g–50 μ g por dosis. Típicamente la emulsión de aceite (preferiblemente emulsión de aceite en agua) comprenderá del 2 al 10 % de aceite metabolizable. Preferiblemente comprenderá del 2 al 10 % de escualeno, del 2 al 10 % de alfatocoferol y del 0,3 al 3 % (preferiblemente 0,4–2 %) de emulsionante (preferiblemente Tween 80 [polioxietileno sorbitán monooleato]). Donde tanto el escualeno como el alfatocoferol están presentes, preferiblemente la relación de escualeno: alfatocoferol es igual a o inferior a 1 puesto que esto proporciona una emulsión más estable. Span 85 (sorbitán trioleato) puede también estar presente a un nivel del 0,5 al 1 % en las emulsiones usadas en la invención. En algunos casos puede ser ventajoso que las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la presente invención contengan además un estabilizante, por ejemplo otros emulsionantes/tensioactivos, incluyendo ácido caprílico (Merck Index 10ª edición, entrada número: 1739), de los que se prefiere particularmente la tricaprilina.

Donde se incluyen el escualeno y una saponina (preferiblemente QS21), es también ventajoso incluir un esteroles (preferiblemente colesterol) a la formulación puesto que esto permite una reducción en el nivel total de aceite en la emulsión. Esto conduce a un coste reducido de fabricación, mejora del confort global de la vacunación y también mejoras cualitativa y cuantitativa de las respuestas inmunitarias resultantes, tales como producción de IFN- γ mejorada. Por consiguiente, el sistema de adyuvantes de la presente invención comprende típicamente una relación de aceite metabolizable:saponina (p/p) en el intervalo de 200:1 a 300:1, también la presente invención puede usarse en forma de "aceite bajo" cuyo intervalo preferido es 1:1 a 200:1, preferiblemente 20:1 a 100:1 y más preferiblemente, sustancialmente 48:1, esta vacuna retiene las propiedades de adyuvante ventajosas de todos los componentes, con un perfil de reatogenicidad mucho más reducido. Por consiguiente, las realizaciones particularmente preferidas tienen una relación de escualeno:QS21 (p/p) en el intervalo de 1:1 a 250:1, también un intervalo preferido es 20:1 a 200:1, preferiblemente 20:1 a 100:1 y más preferiblemente, sustancialmente 48:1. Preferiblemente un esteroles (más preferiblemente colesterol) también está incluido a una relación de saponina:esteroles descrita en el presente documento.

Los sistemas de emulsión de la presente invención tienen preferiblemente una dimensión de gota de aceite pequeña en el intervalo submicrónico. Lo más preferiblemente las dimensiones de gotas de aceite estarán en el intervalo 120 a 750 nm y más preferiblemente de 120-600 nm de diámetro.

Una formulación de adyuvante particularmente potente (para la combinación final con AIPO4 en las composiciones inmunogénicas de la invención) implica una saponina (preferiblemente QS21), un derivado LPS (preferiblemente 3D-MPL) y una emulsión de aceite (preferiblemente escualeno y alfatocoferol en una emulsión aceite en agua) como se

describe en el documento WO 95/17210 o en el documento WO 99/12565 (en particular la formulación adyuvante 11 en el ejemplo 2, Tabla 1).

Los ejemplos de un agonista TLR 2 incluyen peptidoglicano o lipoproteína. Las imidazoquinolinas, tales como Imiquimod y Resiquimod son agonistas TLR7 conocidos. El ARN de cadena simple es también un agonista TLR conocido (TLR8 en seres humanos y TLR7 en ratones), mientras que el ARN de doble cadena y poli IC (ácido poliinosínico-ácido policitidílico –un mimético sintético comercial de ARN vírico), son ejemplares de los agonistas TLR 3. 3D-MPL es un ejemplo de un agonista TLR4 mientras CPG es un ejemplo de un agonista TLR9.

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

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

Por consiguiente, la presente invención proporciona una formulación adyuvante que comprende el inmunoestimulante que se ha adsorbido sobre una partícula de sal metálica, caracterizada porque la composición está sustancialmente libre de otro antígeno. Además, esta formulación adyuvante puede ser un intermedio que, si se usa tal adyuvante, se requiere para la fabricación de una vacuna. Por consiguiente se proporciona un procedimiento para la fabricación de una vacuna que comprende mezclar una composición adyuvante que es uno o más inmunoestimulantes adsorbidos sobre una partícula metálica con un antígeno. Preferiblemente, el antígeno se ha preadsorbido sobre una sal metálica. Dicha sal metálica puede ser idéntica o similar a la sal metálica que se adsorbe sobre el inmunoestimulante. Preferiblemente la sal metálica es una sal de aluminio, por ejemplo fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

La presente invención proporciona además una composición de vacuna que comprende el inmunoestimulante adsorbido sobre una primera partícula de una sal metálica y el antígeno adsorbido sobre una sal metálica, caracterizada porque la primera y la segunda partícula de sal metálica son partículas distintas.

El LPS o los derivados o mutaciones de LOS o los derivados de lípido A descritos en el presente documento están diseñados para ser menos tóxicos (por ejemplo 3D-MPL) que los lipopolisacáridos nativos y son equivalentes intercambiables respecto de cualesquiera usos de estos residuos descritos en el presente documento. Pueden ser los ligandos TLR4 descritos anteriormente. Otros de tales derivados se describen en los documentos WO020786737, WO9850399, WO0134617, WO0212258, WO03065806.

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

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

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

Este adyuvante puede opcionalmente comprender además 5-60, 10-50, o 20-30 µg (por ejemplo 5-15, 40-50, 10, 20,

30, 40 o 50 µg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL).

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

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

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

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

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

Las preparaciones de vacuna que contienen composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar un mamífero susceptible de infección, mediante la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir la inyección por medio de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o administración por vía mucosal a los aparatos oral/alimentario, respiratorio, tracto genitourinario. Se prefiere la administración intranasal de las vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media (puesto que el transporte nasofaríngeo de neumococos puede evitarse más efectivamente prevenido, atenuando de este modo la infección en una etapa más temprana). Aunque la vacuna de la invención puede administrarse en forma de una dosis única, sus componentes también pueden coadministrarse juntos al mismo tiempo o en diferentes momentos (por ejemplo los conjugados neumococales de sacárido podrían administrarse separadamente, al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de cualquier componente de proteína bacteriana de la vacuna para una coordinación óptima de las respuestas inmunitarias entre sí). Para la coadministración, el adyuvante opcional Th1 puede estar presente en cualquiera o en todas las diferentes administraciones. Además de una administración de vía única, se pueden usar 2 vías diferentes de administración. Por ejemplo, los sacáridos o conjugados de sacárido pueden administrarse IM (o ID) y las proteínas bacterianas pueden administrarse en IN (o ID). Además, las vacunas de la invención pueden administrarse IM para dosis de inicio y para dosis de recuerdo.

El contenido de antígenos de proteína en la vacuna estará típicamente en el intervalo de 1-100 µg, preferiblemente 5-50 µg, más típicamente en el intervalo de 5-25 µg. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o más inmunizaciones de recuerdo adecuadamente espaciadas.

La preparación de vacuna se describe generalmente en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación en liposomas es descrita por Fullerton, Patente de los Estados Unidos 4.235.877.

Las vacunas de la presente invención pueden almacenarse en solución o liofilizadas. Preferiblemente la solución se liofiliza en presencia de un azúcar tal como sacarosa o lactosa. Es además preferible que se liofilice y se reconstituya extemporáneamente antes de su uso. La liofilización puede dar como resultado una composición más estable (vacuna) y puede posiblemente conducir a mayores títulos de anticuerpos en presencia de 3D-MPL y en ausencia de un adyuvante basado en aluminio.

En un aspecto de la invención se proporciona un kit de vacuna, que comprende un vial que contiene una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente en forma liofilizada y que comprende además un vial que contiene un adyuvante descrito en la presente memoria. Se ha de considerar que en este aspecto de la invención, el adyuvante será usado para reconstituir la composición inmunogénica liofilizada.

Aunque las vacunas de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía, la administración de las vacunas descritas en la piel (ID) forma una realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula "córnea", denominada estrato córneo, que cubre la epidermis. Por debajo de la epidermis está una capa denominada la dermis, que a su vez recubre el tejido subcutáneo. Los investigadores han mostrado que la inyección de una vacuna en la piel y en particular en la dermis, estimula una respuesta inmunitaria, que también puede estar asociada a una serie de ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en el presente documento forma una característica preferida de la presente invención.

La técnica convencional de inyección intradérmica, el “procedimiento mantoux”, comprende los pasos de limpieza de la piel y a continuación estirar con una mano y con el biselado de una aguja de calibre estrecho (calibre 26-31) orientado hacia arriba la aguja se inserta con un ángulo de entre 10-15°. Una vez que el biselado de la aguja se inserta, se baja el cilindro de la aguja y se avanza mientras se proporciona una ligera presión para elevarla bajo la piel. El líquido es inyectado luego muy lentamente formando de este modo una ampolla o una hinchazón sobre la superficie de la piel, seguido por retirada lenta de la aguja.

Más recientemente, se han descrito dispositivos que están diseñados específicamente para administrar agentes líquidos dentro o a través de la piel, por ejemplo los dispositivos descritos en los documentos WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección a chorro descritos por ejemplo en los documentos WO 01/13977; US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 y WO 97/13537. Los procedimientos alternativos de administración transdérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para administración balística de vacunas sólidas (documento WO 99/27961), o parches transdérmicos (documentos WO 97/48440; WO 98/28037); o aplicados a la superficie de la piel (administración transdérmica o transcutánea, documentos WO 98/20734; WO 98/28037).

Cuando las vacunas de la presente invención han de administrarse a la piel, o más específicamente dentro de la dermis, la vacuna es de un volumen de líquido bajo, particularmente un volumen de entre aproximadamente 0,05 ml y 0,2 ml.

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

Tal como se usa en el presente documento, el término “administración intradérmica” significa la administración de la vacuna en la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna no se situará necesariamente exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa en la piel situada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm de la superficie en la piel humana, pero hay una cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar alcanzar la dermis yendo 1,5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis está situada entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea inferior. Dependiendo del modo de administración, la vacuna se puede situar finalmente solamente o primariamente dentro de la dermis, o puede finalmente distribuirse dentro de la epidermis y la dermis.

La presente invención se refiere además a una vacuna mejorada para la prevención o la mejora de la otitis media causada por *Haemophilus influenzae* por la adición de las proteínas de *Haemophilus influenzae*, por ejemplo la proteína D en forma libre o conjugada. Además, la presente invención proporciona además una vacuna mejorada para la prevención o la mejora de infección neumococal en niños (por ejemplo, otitis media), contando con la adición de uno o dos proteínas neumococales como proteína libre o conjugada a las composiciones conjugadas de *S. pneumoniae* de la invención. Dichas proteínas libres neumococales pueden idénticas o diferentes a cualesquiera proteínas de *S. pneumoniae* usadas como proteínas portadoras. Uno o más antígenos de proteína de *Moraxella catarrhalis* pueden también incluirse en la vacuna de combinación en una forma libre o conjugada. De este modo, la presente invención es un procedimiento mejorado para provocar una respuesta inmunitaria (protectora) contra la otitis en los niños.

En otra realización, la presente invención, es un procedimiento mejorado para provocar una respuesta inmunitaria (protectora) en niños (definidos como de 0 a 2 años en el contexto de la presente invención) administrando una cantidad segura y efectiva de la vacuna de la invención [una vacuna pediátrica]. Otras realizaciones de la presente invención incluyen la provisión de las composiciones conjugadas de *S. pneumoniae* antigénicas de la invención para su uso en medicina y el uso de los conjugados de *S. pneumoniae* de la invención en la fabricación de un medicamento para la prevención de (o tratamiento) de enfermedad neumococal.

En otra realización, la presente invención es un procedimiento mejorado para provocar una respuesta inmunitaria (protectora) en la población anciana (en el contexto de la presente invención un paciente es considerado anciano si tiene 50 o más años, típicamente 55 años y más generalmente más de 60 años) administrando una cantidad segura y efectiva de la vacuna de la prevención, preferiblemente en conjunción con una o dos proteínas de *S. pneumoniae* presentes como proteínas libre o conjugada, proteínas libres de *S. pneumoniae* proteínas que pueden ser idénticas o diferentes de cualesquiera proteínas de *S. pneumoniae* usadas como proteínas portadoras.

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

Otro aspecto de la invención es el uso de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por infección por *S. pneumoniae* y opcionalmente por *Haemophilus influenzae*.

Los términos “comprender”, “comprenden” y “comprende” en el presente documento están destinados por los inventores a ser opcionalmente sustituibles por los términos “consistir en”, “consisten en” y “consiste en”, respectivamente, en cada caso.

Las realizaciones de la presente memoria descriptiva se refieren a las “composiciones de vacuna” de la invención que también se pueden aplicar a realizaciones que se refieren a “composiciones inmunogénicas” de la invención y viceversa.

- 5 **Párrafo 1.** Una composición inmunogénica de *Streptococcus pneumoniae* que comprende 10 o más sacáridos capsulares de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* serotipos que están conjugados a una proteína portadora y que comprenden 3 o más proteínas portadoras diferentes, en la que la composición comprende el sacárido capsular del serotipo 19F conjugado al toxoide de la difteria (DT); el sacárido capsular del serotipo 18C conjugado al toxoide tetánico (TT); los sacáridos capsulares de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados a proteína D de *Haemophilus influenzae*.
- 10 **Párrafo 2.** Una composición inmunogénica según cualquier párrafo anterior en la que el sacárido capsular 19F está conjugado a la proteína portadora.
- Párrafo 3.** Una composición inmunogénica según el párrafo 1 en la que el sacárido capsular 19F está conjugado a la proteína portadora por un ligador.
- Párrafo 4.** Una composición inmunogénica según el párrafo 3 en la que el ligador es bifuncional.
- 15 **Párrafo 5.** La composición inmunogénica del párrafo 3 o 4 en la que el ligador es ADH.
- Párrafo 6.** La composición inmunogénica de los párrafos 3, 4 o 5 en la que el ligador está fijado a la proteína portadora por química carbodiimídica, preferentemente usando EDAC.
- Párrafo 7.** La composición inmunogénica de cualquiera de los párrafos 3 a 6 en la que el sacárido está conjugado al ligador antes de que la proteína portadora esté conjugada al ligador.
- 20 **Párrafo 8.** La composición inmunogénica de cualquiera los párrafos 3 a 6 en la que la proteína portadora está conjugada al ligador antes de que el sacárido esté conjugado al ligador.
- Párrafo 9.** La composición inmunogénica de cualquiera de los párrafos anteriores en la que el sacárido 19F está conjugado a la proteína portadora o al ligador usando química de CDAP.
- 25 **Párrafo 10.** La composición inmunogénica de cualquiera de los párrafos anteriores en la que la relación de proteína portadora respecto del sacárido 19F está entre 5:1 y 1:5, 4:1 y 1:1 o 2:1 y 1:1, o 1.5:1 y 1.4:1 (p/p).
- Párrafo 11.** La composición inmunogénica de cualquiera de los párrafos anteriores en la que la dimensión media (por ejemplo M_p) del sacárido 19F está por encima de 100 kDa.
- Párrafo 12.** La composición inmunogénica del párrafo 11 en la que la dimensión media (por ejemplo. M_p) del sacárido 19F está entre 100-750, 110-500, 120-250, o 125 y 150 kDa.
- 30 **Párrafo 13.** La composición inmunogénica del párrafo 11 o 12 en la que el sacárido 19F bien es un polisacárido nativo o bien está dimensionado por un factor no superior a x5.
- Párrafo 14.** La composición inmunogénica del párrafo 11, 12 o 13 en la que el sacárido 19F se ha dimensionado por microfluidización.
- 35 **Párrafo 15.** La composición inmunogénica de cualquiera de los párrafos anteriores en la que la dosis del sacárido conjugado 19F está entre 1 y 10 μg , 1 y 5 μg , o 1 y 3 μg del sacárido.
- Párrafo 16.** Una composición inmunogénica según cualquiera de los párrafos anteriores en la que el sacárido capsular 18C está directamente conjugado a la proteína portadora.
- Párrafo 17.** Una composición inmunogénica según cualquiera de los párrafos 1 a 15 en la que el sacárido capsular 18C está conjugado a la proteína portadora por un ligador.
- 40 **Párrafo 18.** Una composición inmunogénica según el párrafo 17 en la que el ligador es bifuncional.
- Párrafo 19.** La composición inmunogénica del párrafo 17 o 18 en la que el ligador es ADH.
- Párrafo 20.** La composición inmunogénica de los párrafos 17, 18, o 19 en la que el ligador está fijado a la proteína portadora por química carbodiimídica, preferiblemente usando EDAC.
- 45 **Párrafo 21.** La composición inmunogénica de cualquiera de los párrafos 17 a 19 en la que el sacárido está conjugado al ligador antes de que la proteína portadora esté conjugada al ligador.
- Párrafo 22.** La composición inmunogénica de cualquiera de los párrafos 17 a 19 en la que la proteína portadora está conjugada al ligador antes de que el sacárido esté conjugado al ligador.
- Párrafo 23.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior en la que el sacárido 18C está conjugado a la proteína portadora o ligador usando química de CDAP.
- 50 **Párrafo 24.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior en la que el sacárido 18C está conjugado a la proteína portadora o al ligador usando aminación reductora.
- Párrafo 25.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior en la que la relación de la proteína portadora

respecto del sacárido 18C está entre 0,5:1-5:1, 1:1-4:1, 1,5:1-3:1, o 2:1 y 2,5:1 (p/p).

Párrafo 26. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior en la que la dimensión media (por ejemplo M_p) del sacárido 18C es superior a 50 kDa.

5 **Párrafo 27.** La composición inmunogénica del párrafo 26 en la que la dimensión media (por ejemplo M_p) del sacárido 18C está entre 50-500, 60-400, 70-300, 75-200, o 80 y 100 kDa.

Párrafo 28. La composición inmunogénica del párrafo 27 en la que el sacárido 18C bien es un polisacárido nativo o bien está dimensionado por un factor no superior a x5.

Párrafo 29. La composición inmunogénica del párrafo 26, 27 o 28 en la que el sacárido 18C se ha dimensionado por microfluidización.

10 **Párrafo 30.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior en la que la dosis del sacárido conjugado 18C está entre 1 y 10 μg , 1 y 5 μg , o 1 y 3 μg de sacárido.

Párrafo 31. La composición inmunogénica del párrafo 30 en la que la dosis del sacárido conjugado 18C es 3 μg de sacárido.

15 **Párrafo 32.** Una composición inmunogénica según cualquier párrafo anterior que comprende adicionalmente serotipo 3 presente como un sacárido conjugado.

Párrafo 33. Una composición inmunogénica según el párrafo 32 en la que el serotipo 3 está conjugado a la proteína D.

Párrafo 34. Una composición inmunogénica según cualquier párrafo anterior que comprende además (el sacárido capsular conjugado de) serotipo 6A y/o 15B.

20 **Párrafo 35.** Una composición inmunogénica según cualquier párrafo anterior que comprende además (el sacárido capsular conjugado de) serotipo 19A.

Párrafo 36. Una composición inmunogénica según cualquier párrafo anterior que comprende además (el sacárido capsular conjugado de) serotipo 22F.

25 **Párrafo 37.** Una composición inmunogénica según cualquier párrafo anterior que comprende además (el sacárido capsular conjugado de) serotipo 8.

Párrafo 38. Una composición inmunogénica según cualquier párrafo anterior que comprende además (el sacárido capsular conjugado de) serotipo 12F.

Párrafo 39. Una composición inmunogénica según cualquier párrafo anterior en la que al menos uno de los sacáridos capsulares está directamente conjugado a la proteína portadora.

30 **Párrafo 40.** Una composición inmunogénica según cualquier párrafo anterior en la que al menos uno de los sacáridos capsulares está conjugado a la proteína portadora por un ligador.

Párrafo 41. Una composición inmunogénica según el párrafo 40 en la que el ligador es bifuncional.

Párrafo 42. La composición inmunogénica del párrafo 40 o 41 en la que el ligador es ADH.

35 **Párrafo 43.** La composición inmunogénica de los párrafos 40, 41, o 42 en la que el ligador está fijado a la proteína portadora por química carbodiimídica, preferiblemente usando EDAC.

Párrafo 44. La composición inmunogénica de los párrafos 40 a 43 en la que el sacárido está conjugado al ligador antes de que la proteína portadora esté conjugada al ligador.

Párrafo 45. La composición inmunogénica de cualquiera de los párrafos 40 a 43 en la que la proteína portadora está conjugada al ligador antes de que el sacárido esté conjugado al ligador.

40 **Párrafo 46.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior en la que al menos uno de los sacáridos capsulares está conjugado a la proteína portadora y/o al ligador usando química de CDAP.

Párrafo 47. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior en la que al menos uno de los sacáridos capsulares está conjugado a la proteína portadora y/o al ligador usando aminación reductora.

45 **Párrafo 48.** La composición inmunogénica del párrafo 47 en la que el sacárido capsular 3 está conjugado a la proteína portadora y/o ligador usando aminación reductora.

Párrafo 49. La composición inmunogénica del párrafo 47 o 48 en la que el sacárido capsular 1 está conjugado a la proteína portadora y/o al ligador usando aminación reductora.

Párrafo 50. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior en la que la relación de la proteína portadora respecto de los sacáridos está entre 0,5:1-5:1, 1:2 y 2,5:1, 1:1-3,5:1, o 1,3:1-3,0:1.

50 **Párrafo 51.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior en la que la dimensión media (por ejemplo M_p) de los sacáridos (en los sacáridos conjugados) es superior a 50 kDa, por ejemplo, 50-1600, 80-1400, 100-1000,

150-500, o 200-400 kDa.

Párrafo 52. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende el serotipo 1 (sacárido conjugado) que tiene una dimensión media de sacárido (por ejemplo M_p) de entre 100-1000, 200-800, 250-600, o 300 y 400 kDa.

5 **Párrafo 53.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende el serotipo 4 (sacárido conjugado) que tiene una dimensión media de sacárido (por ejemplo M_p) de entre 50-500, 60-300, 70-200, o 75 y 125 kDa.

10 **Párrafo 54.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende el serotipo 5 (sacárido conjugado) que tiene una dimensión media de sacárido (por ejemplo M_p) de entre 100-1000, 200-700, 300-500, o 350 y 450 kDa.

Párrafo 55. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende el serotipo 6B (sacárido conjugado) que tiene una dimensión media de sacárido (por ejemplo M_p) de entre 500-1600, 750-1500, o 1000 y 1400 kDa.

15 **Párrafo 56.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende el serotipo 7F (sacárido conjugado) que tiene una dimensión media de sacárido (por ejemplo M_p) de entre 50-1000, 100-750, 150-500, o 200 y 300 kDa.

Párrafo 57. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende el serotipo 9V (sacárido conjugado) que tiene una dimensión media de sacárido (por ejemplo M_p) de entre 50-1000, 100-750, 150-500, 200-400, o 250 y 300 kDa.

20 **Párrafo 58.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende el serotipo 14 (sacárido conjugado) que tiene una dimensión media de sacárido (por ejemplo M_p) de entre 50-1000, 100-750, 150-500, o 200 y 250 kDa.

25 **Párrafo 59.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende el serotipo 23F (sacárido conjugado) que tiene una dimensión media de sacárido (por ejemplo M_p) de entre 500-1500, 700-1300, 800-1100, o 900 y 1000 kDa.

Párrafo 60. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende el serotipo 19A (sacárido conjugado) que tiene una dimensión media de sacárido (por ejemplo M_p) de entre 50 y 800kDa, 110 y 700 kDa, 110-300, 120-200, 130-180, o 140-160 kDa.

30 **Párrafo 61.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende el serotipo 22F (sacárido conjugado) que tiene una dimensión media de sacárido (por ejemplo M_p) de entre 50 y 800 kDa, 110 y 700 kDa, 110-300, 120-200, 130-180, o 150-170 kDa.

Párrafo 62. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende el serotipo 6A (sacárido conjugado) que tiene una dimensión media de sacárido (por ejemplo M_p) de entre 500 y 1600 kDa, o 1100 y 1540 kDa.

35 **Párrafo 63.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende el serotipo 3 (sacárido conjugado) que tiene una dimensión media de sacárido (por ejemplo M_p) de entre 50 y 1000 kDa, 60 y 800, 70 y 600, 80 y 400, 100 y 300, o 150 y 250 kDa.

Párrafo 64. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende los serotipos 5, 6B y 23F como sacáridos nativos.

40 **Párrafo 65.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior en la que la dosis de los sacáridos capsulares conjugados está entre 1 y 10 μg , 1 y 5 μg , o 1 y 3 μg de sacárido por conjugado.

Párrafo 66. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende conjugados de serotipos 4, 18C y 19F a dosificaciones de 3 μg de sacárido por conjugado.

45 **Párrafo 67.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende conjugados de serotipos 1, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F a dosificaciones de 1 μg de sacárido por conjugado.

Párrafo 68. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende conjugados de serotipos 6A y/o 3 a dosificaciones de 1 μg de sacárido por conjugado.

Párrafo 69. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende conjugados de serotipos 19A y/o 22F a dosificaciones de 3 μg de sacárido por conjugado.

50 **Párrafo 70.** La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende además sacáridos de *S. pneumoniae* no conjugados de serotipos diferentes de los conjugados, de manera que el número de serotipos de sacáridos conjugados y no-conjugados es inferior o igual a 23.

Párrafo 71. La composición inmunogénica de cualquier párrafo anterior que comprende además una o más proteínas de *S. pneumoniae* conjugadas o no conjugadas.

55 **Párrafo 72.** La composición inmunogénica del párrafo 71 que comprende una o más proteínas de *S. pneumoniae* no conjugadas.

- Párrafo 73.** La composición inmunogénica del párrafo 71 o 72 en la que dichas una o más proteínas de *S. pneumoniae* se seleccionan a partir de la familia de tríada de polihistidina (PhtX), la familia de la proteína de unión de colina (CbpX), truncados de CbpX, la familia LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas de truncados CbpX-truncados LytX, neumolisina detoxificada (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133.
- 5 **Párrafo 74.** La composición inmunogénica de los párrafos 71, 72 o 73 que comprende neumolisina.
- Párrafo 75.** La composición inmunogénica de cualquiera de los párrafos 71 a 74 que comprende una proteína PhtX.
- Párrafo 76.** Una composición inmunogénica según cualquier párrafo anterior que comprende neumolisina como proteína libre o portadora.
- 10 **Párrafo 77.** Una composición inmunogénica según cualquier párrafo anterior que comprende una proteína PhtX como proteína libre o portadora.
- Párrafo 78.** La composición inmunogénica del párrafo 77 en la que dicha proteína PhtX es PhtD o una proteína de fusión PhtBD o PhtDE.
- Párrafo 79.** Una composición inmunogénica según cualquier párrafo anterior que comprende además un adyuvante.
- 15 **Párrafo 80.** Una composición inmunogénica según el párrafo 79 en la que el adyuvante es un inductor preferencial de una respuesta Th1.
- Párrafo 81.** Una composición inmunogénica según el párrafo 79 u 80 en la que el adyuvante comprende uno o más componentes seleccionados entre QS21, MPL® o un oligonucleótido inmunoestimulador.
- Párrafo 82.** Una composición inmunogénica según cualquiera de los párrafos 79 a 80 en la que el adyuvante comprende QS21 y MPL.
- 20 **Párrafo 83.** La composición inmunogénica del párrafo 79, en la que el adyuvante comprende un portador de liposomas.
- Párrafo 84.** La composición inmunogénica del párrafo 83, en la que el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 0,1-10 mg, 0,2-7, 0,3-5, 0,4-2, o 0,5-1 mg (por ejemplo 0,4-0,6, 0,9-1,1, 0,5 o 1 mg) de fosfolípido (por ejemplo DOPC).
- 25 **Párrafo 85.** La composición inmunogénica del párrafo 83 u 84, en la que el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3, o 0,125-0,25 mg (por ejemplo 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 o 0,125 mg) de esteroles (por ejemplo colesterol).
- Párrafo 86.** La composición inmunogénica de los párrafos 83-85, en la que el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 5-60, 10-50, o 20-30 µg (por ejemplo 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 µg) de un derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL).
- 30 **Párrafo 87.** La composición inmunogénica de los párrafos 83-86, en la que el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 5-60, 10-50, o 20-30 µg (por ejemplo 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 µg) de saponina (por ejemplo QS21).
- Párrafo 88.** La composición inmunogénica del párrafo 79, en la que el adyuvante comprende una emulsión de aceite en agua.
- 35 **Párrafo 89.** La composición inmunogénica del párrafo 88, en la que el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 0,5-15, 1-13, 2-11, 4-8, o 5-6 mg (por ejemplo 2-3, 5-6, o 10-11 mg) de aceite metabolizable (tal como escualeno).
- Párrafo 90.** La composición inmunogénica del párrafo 88 u 89, en la que el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 0,1-10, 0,3-8, 0,6-6, 0,9-5, 1-4, o 2-3 mg (por ejemplo 0,9-1,1, 2-3 o 4-5 mg) de emulsionante (tal como Tween 80).
- 40 **Párrafo 91.** La composición inmunogénica de los párrafos 88-90, en la que el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 0,5-20, 1-15, 2-12, 4-10, 5-7 mg (por ejemplo 11-13, 5-6, o 2-3 mg) de tocol (tal como alfatocoferol).
- Párrafo 92.** La composición inmunogénica de los párrafos 88-91, en la que el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 5-60, 10-50, o 20-30 µg (por ejemplo 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 µg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL).
- 45 **Párrafo 93.** La composición inmunogénica de los párrafos 88-92, en la que el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3, o 0,125-0,25 mg (por ejemplo 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 o 0,125 mg) de esteroles (por ejemplo colesterol).
- Párrafo 94.** La composición inmunogénica de los párrafos 88-93, en la que el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 5-60, 10-50, o 20-30 µg (por ejemplo 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 µg) de saponina (por ejemplo QS21).
- 50 **Párrafo 95.** La composición inmunogénica del párrafo 79, en la que el adyuvante comprende una sal metálica y un derivado de lípido A.
- Párrafo 96.** La composición inmunogénica del párrafo 95, en la que el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 100-750, 200-500, o 300-400 µg de Al como fosfato de aluminio.

- Párrafo 97.** La composición inmunogénica del párrafo 95 o 96, en la que el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 5-60, 10-50, o 20-30 µg (por ejemplo 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 o 50 µg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL).
- 5 **Párrafo 98.** Un kit de vacuna que comprende una composición inmunogénica según cualquiera de los párrafos 1 a 78 y que comprende además para administración concomitante o secuencial un adyuvante tal como se define en cualquiera de los párrafos 80 a 97.
- Párrafo 99.** Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 97 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 **Párrafo 100.** Un procedimiento para elaborar la vacuna según el párrafo 99 que comprende la etapa de mezclar la composición inmunogénica de cualquiera de los párrafos 1 a 97 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Párrafo 101.** Un procedimiento de inmunizar a un huésped humano contra la enfermedad causada por infección por *Streptococcus pneumoniae* que comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica de cualquiera de los párrafos 1 a 97 o vacuna según el párrafo 99.
- 15 **Párrafo 102.** El procedimiento del párrafo 101, en la que el huésped humano es anciano y la enfermedad es una o ambas de la neumonía o la enfermedad neumococal invasiva (ENI).
- Párrafo 103.** El procedimiento del párrafo 101 o 102, en el que el huésped humano es anciano y la enfermedad son exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
- Párrafo 104.** El procedimiento del párrafo 101, en el que el huésped humano es un niño y la enfermedad es otitis media.
- 20 **Párrafo 105.** El procedimiento del párrafo 101 o 104, en el que el huésped humano es un niño y la enfermedad es meningitis y/o bacteremia.
- Párrafo 106.** El procedimiento de los párrafos 101, 104 o 105, en el que el huésped humano es un niño y la enfermedad es neumonía y/o conjuntivitis.
- 25 **Párrafo 107.** La composición inmunogénica de los párrafos 1 a 97 o la vacuna según el párrafo 99 para usar en el tratamiento o prevención de la enfermedad causada por la infección por *Streptococcus pneumoniae*.
- Párrafo 108.** Un uso de la composición inmunogénica de párrafos 1 a 97 o la vacuna del párrafo 99 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por infección por *Streptococcus pneumoniae*.
- 30 **Párrafo 109.** El uso del párrafo 108, en el que la enfermedad es una o ambas de la neumonía o la enfermedad neumococal invasiva (ENI) de personas ancianas.
- Párrafo 110.** El uso del párrafo 108 o 109, en el que la enfermedad son exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) de personas ancianas.
- Párrafo 111.** El uso del párrafo 108, en el que la enfermedad es otitis media de niños.
- Párrafo 112.** El uso de los párrafos 108 o 111, en el que la enfermedad es meningitis y/o bacteremia de niños.
- 35 **Párrafo 113.** El uso de los párrafos 108, 111 o 112, en el que la enfermedad es neumonía y/o conjuntivitis de niños.
- Párrafo 114.** Un uso de la composición inmunogénica de los párrafos 1 a 97 o la vacuna del párrafo 99 que comprende un sacárido conjugado capsular de serotipo 19F pero que no comprende el sacárido capsular de serotipo 19A en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por infección por *Streptococcus pneumoniae* por cepas de serotipo 19A.
- 40 **Párrafo 115.** Un procedimiento de inmunización de un huésped humano contra la enfermedad causada por infección por *Streptococcus pneumoniae* de serotipo 19A que comprende las etapas de administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica de los párrafos 1 a 97 o la vacuna del párrafo 99 que comprende un sacárido conjugado capsular de serotipo 19F pero que no comprende el sacárido capsular de serotipo 19A.
- 45 **Párrafo 116.** Un procedimiento de provocar una respuesta inmunoprotectora en niños contra la otitis media que comprende la administración como componentes separados o combinados, secuencialmente o concomitantemente (i) de una composición inmunogénica o vacuna según cualquiera de los párrafos 1 a 99 y (ii) proteína D de *Haemophilus influenzae* cuya proteína D puede estar libre y/o conjugada.
- Párrafo 117.** Un procedimiento de provocar una respuesta inmunoprotectora a niños contra *S. pneumoniae* administrando la composición inmunogénica o vacuna de cualquier reivindicación anterior.
- 50 **Párrafo 118.** Un procedimiento de provocar una respuesta inmunoprotectora a los ancianos contra *S. pneumoniae* administrando en combinación, secuencial o concomitantemente (i) la composición inmunogénica o vacuna de cualquier párrafo anterior (ii) una o más proteínas de superficie de *S. pneumoniae* seleccionadas del grupo que consiste en la familia PhtX y la neumolisina.
- 55 **Párrafo 119.** Un procedimiento de provocar una respuesta inmunoprotectora a los niños contra la otitis media administrando la composición inmunogénica o vacuna de cualquier párrafo anterior.

Párrafo 120. Un procedimiento de provocar una respuesta inmunoprotectora a los niños contra la otitis media administrando como componentes separados o combinados, secuencial o concomitantemente (i) la vacuna de cualquier párrafo anterior (ii) una o más proteínas de superficie de *S. pneumoniae* seleccionadas del grupo que consiste en la familia PhtX y la neumolisina.

5 **Párrafo 121.** La composición inmunogénica de los párrafos 1-97 o la vacuna del párrafo 91, que comprende conjugados de sacárido derivados de al menos todos los siguientes serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F en la que el título de anticuerpo GMC inducido contra uno o más de los componentes de vacuna 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en los vacunados humanos.

10 **Párrafo 122.** La composición inmunogénica del párrafo 121, en la que el título de anticuerpo GMC inducido contra el serotipo 4 no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en los vacunados humanos.

Párrafo 123. La composición inmunogénica de los párrafos 121 o 122, en la que el título de anticuerpo GMC inducido contra el serotipo 6B no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en los vacunados humanos.

15 **Párrafo 124.** La composición inmunogénica de los párrafos 121-123, en la que el título de anticuerpo GMC inducido contra el serotipo 9V no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en los vacunados humanos.

Párrafo 125. La composición inmunogénica de los párrafos 121-124, en la que el título de anticuerpo GMC inducido contra el serotipo 14 no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en los vacunados humanos.

20 **Párrafo 126.** La composición inmunogénica de los párrafos 121-125, en la que el título de anticuerpo GMC inducido contra el serotipo 18C no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en los vacunados humanos.

Párrafo 127. La composición inmunogénica de los párrafos 121-126, en la que el título de anticuerpo GMC inducido contra el serotipo 19F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en los vacunados humanos.

25 **Párrafo 128.** La composición inmunogénica de los párrafos 121-127, en la que el título de anticuerpo GMC inducido contra el serotipo 23F no es significativamente inferior al inducido por la vacuna Pevnar® en los vacunados humanos.

Párrafo 129. La composición inmunogénica de los párrafos 121-128 que comprende un conjugado sacárido de serotipo 3.

30 **Párrafo 130.** La composición inmunogénica de los párrafos 121-129 que comprende un conjugado sacárido de serotipo 6A.

Párrafo 131. La composición inmunogénica de los párrafos 121-130 que comprende un conjugado sacárido de serotipo 19A.

35 **Párrafo 132.** La composición inmunogénica de los párrafos 121-131 que comprende un conjugado sacárido de serotipo 22F.

Con el fin de que esta invención sea entendida mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos solo tienen un fin ilustrativo y no apuntan de modo alguno a limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: expresión de proteína d

40 Proteína D de *Haemophilus influenzae*

Construcción genética para expresión de la proteína D

Materiales de partida

El ADN que codifica la Proteína D

45 La proteína D se conserva en gran medida entre *H. influenzae* de todos los serotipos y cepas no tipificables. El vector pHC348 que contiene la secuencia de ADN que codifica todo el gen de la proteína D se ha obtenido por el Dr. A. Forsgren, Departamento de Microbiología Médica, Universidad de Lund, Malmö Hospital General de Malmö, Suecia. La secuencia de ADN de la proteína D se ha publicado por Janson et al. (1991) Infect. Immun. 59: 119-125.

El vector de expresión pMG1

50 El vector de expresión pMG1 es un derivado de pBR322 (Gross *et al.*, 1985) en el que se introdujeron los elementos de control derivados del bacteriófago λ para la transcripción y la traducción de genes insertados extraños (Shatzman *et al.*, 1983). Además, el gen de resistencia a la ampicilina se cambió por el gen de resistencia a la kanamicina.

La cepa de *E. coli* AR58

La cepa de *E. coli* AR58 se generó por transducción de N99 con un depósito de fagos P1 previamente cultivado en

un derivado SA500 (galE::TN10, lambdaKil- cl857 ΔH1). N99 y SA500 son cepas de *E. coli* K12 derivadas del laboratorio del Dr. Martin Rosenberg en el Instituto Nacional de la Salud.

El vector de expresión pMG 1

5 Para la producción de la proteína D, el ADN que codifica la proteína se ha clonado en el vector de expresión pMG 1. Este plásmido utiliza señales del ADN de fago lambda para conducir la transcripción y la traducción de genes
 10 extraños insertados. El vector contiene el promotor PL, el operador OL y dos sitios de utilización (NutL y NutR) para aliviar los efectos de polaridad de transcripción cuando se proporciona la proteína N (Gross *et al.*, 1985). Los vectores que contienen el promotor PL, se introducen en un huésped lisogénico de *E. coli* para estabilizar el ADN plasmídico. Las cepas del huésped lisogénico contienen ADN de fago lambda defectivo en replicación integrado en
 15 el genoma (Shatzman *et al.*, 1983). El ADN de fago lambda cromosómico dirige la síntesis de la proteína represora cl que se une al represor OL del vector y evita la unión de la polimerasa de ARN al promotor PL y por lo tanto la transcripción del gen insertado. El gen cl de la cepa de expresión AR58 contiene un mutante sensible a la temperatura de manera que la transcripción dirigida de PL puede regularse por desplazamiento de temperatura, es decir un incremento en temperatura de cultivo inactiva el represor y se inicia la síntesis de la proteína extranjera. Este sistema de expresión permite la síntesis controlada de proteínas extranjeras especialmente las que pueden ser tóxicas para la célula (Shimataka & Rosenberg, 1981).

La cepa AR58 de *E. coli* AR58

20 La cepa lisogénica AR58 de *E. coli* usada para la producción del portador proteína D es un derivado de la cepa N99 de *E. coli* K12 estándar NIH (F⁻ su- galK2, lacZ⁻ thr⁻). Contiene un fago lambda lisogénico defectivo (galE::TN10, lambdaKil- cl857 ΔH1). El fenotipo Kil- evita el corte de la síntesis macromolecular del huésped. La mutación cl857 confiere una lesión sensible a la temperatura al represor cl. La delección ΔH1 elimina el operón derecho del fago lambda y los loci bio, uvr3 y chlA de huéspedes. La cepa AR58 se generó por transducción de N99 con un depósito de fagos P1 previamente cultivado en un derivado SA500 (galE::TN10, lambdaKil- cl857 ΔH1). La introducción del lisógeno defectivo en N99 se seleccionó con tetraciclina gracias a la presencia de un transposón TN10 que codifica la resistencia de la tetraciclina en el gen galE adyacente.
 25

Construcción del vector pMGMDPPrD

30 El vector pMG 1 que contiene el gen que codifica la proteína S1 no estructural del virus Influenzae (pMGNS1) se usó para construir pMGMDPPrD. El gen de la proteína D se amplificó por PCR a partir del vector pHC348 (Janson *et al.* 1991 Infect. Immun. 59:119-125) con cebadores de PCR que contienen sitios de restricción NcoI y XbaI en los extremos 5' y 3', respectivamente. El fragmento NcoI/XbaI se introdujo entonces en pMGNS1 entre NcoI y XbaI creando de este modo una proteína de fusión que contiene los 81 aminoácidos N-terminales de la proteína NS1 seguida de la proteína PD. Este vector se denominó pMGNS1PrD.

35 Basado en la construcción descrita anteriormente, se generó la construcción final para la expresión de la proteína D. Se retiró un fragmento BamHI/BamHI de pMGNS1PrD. Esta hidrólisis de ADN eliminó la región de codificación NS1, excepto para los tres primeros residuos N-terminales. Al realizarse la religación del vector, se ha generado un gen que codifica una proteína de fusión con la siguiente secuencia de aminoácidos N-terminales:

----MDP SSHSSNMANT----

NS1 Proteína D

40 La proteína D no contiene un péptido líder ni la cisteína N-terminal a la que la cadena lipídica se fija normalmente. La proteína por no tanto no se excreta en el periplasma ni se lipida y permanece en el citoplasma en una forma soluble.

La construcción final pMG-MDPPrD se introdujo en la cepa huésped AR58 por choque térmico a 37 °C. Las bacterias que contienen el plásmido se seleccionaron en presencia de Kanamicina. La presencia del inserto de ADN que codifica la proteína D se demostró por digestión del ADN plasmídico aislado con endonucleasas seleccionadas. La cepa recombinante de *E. coli* se denomina ECD4.

45 La expresión de la proteína D está sometida al control del promotor P_L/operador O_L de lambda. La cepa huésped AR58 contiene un gen cl sensible a la temperatura en el genoma que bloquea la expresión del P_L de lambda a baja temperatura por unión a O_L. Una vez que la temperatura se ha elevado, cl se libera de O_L y se expresa la proteína D.

Preparación a pequeña escala

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

50 La extracción de las células cosechadas y la purificación de la proteína D se realizó como sigue. El sedimento del cultivo de células congelado se derritió y resuspendió en una solución de disrupción de células (tampón citrato pH 6,0) a una DO₆₅₀ final = 60. La suspensión se hace pasar dos veces por un homogeneizador de alta presión a P = 1000 bares. El homogenado de crecimiento celular se aclaró por centrifugación y el residuo celular se elimina por filtración. En el primer paso de filtración el lisado filtrado se aplica a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (flujo rápido de sefrosa SP). PD se une a la matriz de gel por interacción iónica y se eluye por un incremento de nivel de la fuerza iónica del tampón de elución.
 55

En un segundo paso de purificación las impurezas se retienen en una matriz de intercambio aniónico (flujo rápido de sefrosa Q). PD no se une sobre el gel y puede recogerse en el flujo.

60 En ambos pasos de cromatografía en columna la recogida de fracciones se somete a seguimiento por DO. El flujo a través de la cromatografía en columna de cambio aniónico que contiene la proteína D purificada se concentra por

ultrafiltración.

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

Preparación a gran escala

- 5 La extracción de las células cosechadas y la purificación de proteína D se realizó con sigue. El caldo de cultivo se enfría y se hace pasar directamente dos veces a través de un homogenizador de alta presión a una presión de aproximadamente 800 bares.

10 En el primer paso de purificación el homogenado de cultivo celular se diluye y se aplica a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (grandes perlas de Sefarosa SP). PD se une a la matriz de gel por interacción iónica y se eluye por un incremento de nivel de la fuerza iónica del tampón de elusión y se filtra.

En un segundo paso de purificación las impurezas se retienen en una matriz de intercambio aniónico (flujo rápido de sefarosa Q). PD no se une sobre el gel y se puede recoger en el flujo.

15 En ambos pasos de cromatografía en columna la recogida de fracciones se somete a seguimiento por DO. El flujo a través de la cromatografía de intercambio aniónico que contiene la proteína D purificada se concentra y se diafiltra por ultrafiltración.

La proteína D que contiene el concentrado de ultrafiltración pasa finalmente a través de una membrana de 0,2 µm.

Ejemplo 1b: expresión de PhtD

20 La proteína PhtD es un miembro de la familia de proteínas de tríada de histidina neumococal (Pht) caracterizada por la presencia de tríadas de histidina (resto HXXHXHf). PhtD es una molécula de 838 aa y lleva 5 tríadas de histidina (véase SEQ ID NO: 4 del documento WO00/37105 de MedImmune para secuencia de aminoácidos y SEQ ID NO: 5 del documento WO00/37105 de MedImmune para secuencia de ADN). PhtD también contiene una región rica en prolina en el medio (posición de aminoácidos 348-380). PhtD tiene una secuencia señal N-terminal de 20 aa con un resto LXXC.

Construcción genética

25 La secuencia genética de la proteína PhtD de MedImmune madura (del aa 21 al aa 838) se transfirió de manera recombinante a *E. coli* usando el vector pTCMP14 interno que lleva el promotor p_λ. La cepa huésped de *E. coli* es AR58, que lleva el represor termosensible cl857, que permite la inducción por calor del promotor.

30 La reacción en cadena de polimerasa se realizó amplificando el gen *phtD* a partir de un plásmido de MedImmune (que lleva el gen *phtD* de la cepa Norway 4 de *Streptococcus pneumoniae* (serotipo 4) –SEQ ID NO: 5 como se ha descrito en el documento WO 00/37105). Los cebadores, específicos para el gen *phtD* solamente, se usaron para amplificar el gen *phtD* en dos fragmentos. Los cebadores llevan bien los sitios de restricción *NdeI* y *KpnI* o bien los sitios de restricción *KpnI* y *XbaI*. Estos cebadores no se hibridan con cualquier nucleótido del vector sino solamente con las secuencias específicas del gen *phtD*. Un codón de inicio artificial ATG se insertó usando el primer cebador que lleva el sitio de restricción *NdeI*. Los productos de PCR generados se insertaron en el vector de clonación pGEM-T (Promega) y se confirmó la secuencia de ADN. La subclonación de los fragmentos en el vector de expresión TCMP14 se realizó luego usando técnicas estándar y el vector se transformó en AR58 *E. coli*.

Purificación de PhtD

La purificación de PhtD se llevó a cabo como sigue:

- 40
- Crecimiento de células de *E. coli* en presencia de kanamicina: crecimiento de 30 horas a 30 °C a continuación inducción durante 18 horas a 39,5 °C.
 - Ruptura de las células de *E. coli* del cultivo completo a DO ±115 en presencia de EDTA 5 mM y PMSF 2 mM como inhibidores de proteasas: Rannie, 2 pasadas, 1000 bares.
 - Captura de antígenos y retirada de residuos de células sobre una cromatografía Streamline Q XL en modo de lecho expandido a temperatura ambiente (20 °C); la columna se lavó con NaCl 150 mM + Empigen al 0,25 % pH 6,5 y se eluyó con NaCl 400 mM + Empigen al 0,25 % en 25 mM de tampón fosfato potásico pH 7,4.
 - Filtración sobre cartucho Sartobran 150 (0,45 + 0,2 µm)
 - Unión de antígenos en cromatografía FF IMAC de sefarosa quelante de Zn²⁺ a pH 7,4 en presencia de 5 mM de imidazol a 4°C; la columna se lava con imidazol 5 mM y Empigen al 1 % y eluyó con imidazol 50 mM, ambos en tampón de fosfato potásico 25 mM de pH 8,0.
 - 50 □ Cromatografía de intercambio aniónico débil en modo positivo sobre Fractogel EMD DEAE a pH 8,0 (25 mM de fosfato potásico) a 4 °C; la columna se lavó con NaCl 140 mM y se eluyó a NaCl 200 mM mientras que los contaminantes (proteínas y ADN) permanecieron adsorbidos en el intercambiador.
 - Concentración y ultrafiltración con Na 2 mM/fosfato potásico pH 7,15 sobre una membrana de 50 kDa.
 - Filtración esterilizadora del lote purificado sobre un cartucho de filtro Millipak 20 de 0,2 µm.

Ejemplo 1c: expresión de neumolisina

La neumolisina neumococal se preparó y detoxificó como se describe en los documentos WO2004/081515 y WO2006/032499.

Ejemplo 2:**5 Preparación de conjugados**

Se conoce bien en la técnica cómo purificar polisacáridos neumococales. Para los fines de estos ejemplos los polisacáridos se han realizado esencialmente como se describe en el documento EP072513 o por procedimientos muy relacionados. Antes de la conjugación los polisacáridos pueden dimensionarse por microfluidización como se describe más adelante.

10 Las condiciones de activación y acoplamiento son específicas para cada polisacárido. Estas se dan en la Tabla 1. El polisacárido dimensionado (excepto para PS5, 6B y 23F) se disolvió en NaCl 2M, NaCl 0,2M o en agua para inyección (WFI). La concentración de polisacáridos óptima se evaluó para todos los serotipos. Todos los serotipos excepto el serotipo 18C se conjugaron directamente a la proteína portadora como se detalla más adelante. Se realizaron dos conjugados alternativos de serotipo 22F; uno conjugado directamente, uno a través de un ligador ADH.

15 A partir de una solución de depósito de 100 mg/ml en acetonitrilo o solución de acetonitrilo/agua al 50 %/50 %, se añadió CDAP (relación de CDAP/PS 0,5-1,5 mg/mg PS) a la solución de polisacárido. 1,5 minutos más tarde, se añadió NaOH 2M-0,3M para obtener el pH de activación específico. La activación de polisacárido se llevó a cabo a este pH durante 3 minutos a 25 °C. La proteína purificada (proteína D, PhtD, neumolisina o DT) (la cantidad depende de la relación inicial de PS/proteína portadora) se añadió al polisacárido activado y se llevó a cabo la reacción de acoplamiento al pH específico durante hasta 2 horas (dependiendo del serotipo) en regulación de pH. Con el fin de inactivar los grupos cianato no reaccionados, se añadió entonces una solución de glicina 2M a la mezcla. El pH se ajustó al pH de inactivación (pH 9,0). La solución se agitó durante 30 minutos a 25 °C y a continuación una noche a 2-8 °C con agitación lenta continua.

25 Preparación de 18C:

18C se ligó a la proteína portadora mediante un ligador-dihidrazida de ácido adípico (ADH). El polisacárido de serotipo 18C se microfluidizó antes de la conjugación.

Derivatización del toxoide del tétanos con EDAC

30 Para la derivatización del toxoide tetánico, se diluyó TT purificado a 25 mg/ml en NaCl 0,2M y el espaciador ADH se añadió para alcanzar una concentración final de 0,2M. Cuando se completó la disolución del espaciador, el pH se ajustó a 6,2. Se añadió luego EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida) para alcanzar una concentración final de 0,02M y la mezcla se agitó durante 1 hora en regulación de pH. La reacción de condensación se detuvo incrementando el pH hasta 9,0 durante al menos 30 minutos a 25 °C. El TT derivatizado se diafiltró entonces (membrana CO de 10 kDa) para retirar el reactivo residual ADH y EDAC.

35 El lote de TT_{AH} se filtró de manera estéril finalmente hasta el paso de acoplamiento y se almacenó a -70 °C.

Acoplamiento químico de TT_{AH} a PS 18C

Los detalles de los parámetros de conjugación pueden encontrarse en la Tabla 1.

2 gramos de PS microfluidizado se diluyeron a la concentración definida en agua y se ajustaron a NaCl 2M por la adición de polvo de NaCl.

40 La solución de CDAP (100 mg/ml recién preparada en acetonitrilo/WFI 50/50 v/v) se añadió para alcanzar la relación apropiada de CDAP/PS.

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

45 Después de 3 minutos, se añadió TT_{AH} derivatizado (20 mg/ml en NaCl 0,2 M) para alcanzar una relación TT_{AH}/PS de 2; el pH se reguló al pH 9,0 de acoplamiento. La solución se dejó una hora en regulación de pH.

Para inactivar, una solución de glicina 2M, se añadió a la mezcla PS/TT_{AH}/CDAP.

El pH se ajustó al pH de inactivación (pH 9,0).

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

Conjugado PS22F_{AH}-PhtD

50 En un segundo procedimiento de conjugación para este sacárido (siendo el primero el procedimiento de conjugación de PS22-PhtD directo mostrado en la Tabla 1), 22F se unió a la proteína portadora mediante un ligador-dihidrazida de ácido adípico (ADH). El polisacárido de serotipo 22F se microfluidizó antes de la conjugación.

Derivatización de PS 22F

La activación y el acoplamiento se llevaron a cabo a 25°C con agitación continua en un baño de agua de temperatura controlada.

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

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

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

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

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

Acoplamiento

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

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

- 20 El conjugado resultante tiene una relación final de PhtD/PS de 4,1 (p/p), un contenido de PS libre inferior al 1 % y una antigenicidad (α-PS/a-PS) del 36,3 % y antigenicidad anti-PhtD del 7,4 %.

Purificación de los conjugados:

- 25 Los conjugados se purificaron por filtración en gel usando una columna de filtración en gel Sefacril S400HR equilibrada con NaCl 0,15M (S500HR para 18C) para eliminar pequeñas moléculas (incluyendo DMAP) y PS no conjugado y proteína. En base a las diferentes dimensiones moleculares de los componentes de reacción, se eluyen en primer lugar los conjugados PS-PD, PS-TT, PS-PhtD, PS-neumolisina o PS-DT, seguidos por PS libre, a continuación por PD libre o DT libre y finalmente DMAP y otras sales (NaCl, glicina).

- 30 Las fracciones que contienen conjugados se detectan por UV_{280 nm}. Las fracciones se agrupan según su K_d, se filtran en condiciones estériles (0,22 µm) y se almacenan a +2-8 °C. Se determinaron las relaciones de PS/Proteína en las preparaciones de conjugados.

Condiciones de activación/acoplamiento/inactivación específicas de PSS. pneumoniae-conjugados de proteína D/TT/DT/PhtD/PIy

- 35 Donde “µfluidido” aparece en el encabezamiento de una fila, indica que el sacárido se dimensionó por microfluidización antes de la conjugación. Las dimensiones de los sacáridos después de la microfluidización se dan en la tabla 2.

Tabla 1. Condiciones de activación/acoplamiento/inactivación específicas de PSS. pneumoniae-conjugados de proteína D/TT/DT/PhtD/Ply

Serotipo	1 µfluido	4 µfluido	5	6A	6B	7F µfluido
Conc. de PS (mg/ml)	2,5	2,5	7,1	5,0	5,0	5,0
Disolución de PS	WFI	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
Conc. de PD (mg/ml)	10,0	10,0	5,0	5,0	5,0	10,0
Relación inicial de PD/PS (p/p)	1,5/1	1,5/1	1/1	1/1	1,1/1	1,2/1
Conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,50	0,50	0,79	0,83	0,83	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0
Serotipo	9V µfluido	14 µfluido	18C µfluido	19A µfluido	19F µfluido	22F µfluido
PS conc. (mg/ml)	5,0	5,0	4,5	15,0	9,0	6,0
Disolución de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 0,2M
Proteína portadora conc. (mg/ml)	10,0	10,0	20,0 (TT)	10,0 (Ply)	20,0 (DT)	10,0 (PhtD)
Relación inicial de proteína portadora/PS (p/p)	1,2/1	1,2/1	2/1	2,5/1	1,5/1	3/1
Conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,50	0,75	0,75	1,5	1,5	1,5
pH _a =pH _c =pH _q	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0
Nota: pH _a ,c,q corresponde al pH para activación, acoplamiento e inactivación, respectivamente.						

Caracterización:

Cada conjugado se caracterizó y cumplió las especificaciones descritas en la Tabla 2. El contenido de polisacárido (µg/ml) se midió por el ensayo de resorcinol y el contenido de proteína (µg/ml) por el ensayo de Lowry. La relación final de PS/PD (p/p) se determina por la relación de las concentraciones.

5 **Contenido de polisacárido libre (%):**

El contenido de polisacárido libre de conjugados mantenidos a 4 °C o almacenados durante 7 días a 37 °C se determinó sobre el sobrenadante obtenido después de la incubación con anticuerpos contra proteína α-portadora y con sulfato de amonio saturado, seguida de una centrifugación.

10 Se usó un ELISA de α-PS/α-PS para la cuantificación de polisacárido libre en el sobrenadante. La ausencia de conjugado también se controló mediante un ELISA de proteína α-portadora/α-PS.

Antigenicidad:

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

Contenido de proteína libre (%):

15 La proteína portadora no conjugada se puede separar del conjugado durante el paso de purificación. El contenido de la proteína residual libre se determinó usando cromatografía de exclusión por tamaño (TSK 5000-PWXL) seguida de la detección por UV (214 nm). Las condiciones de elución permitieron separar la proteína portadora libre y el conjugado. El contenido de proteína libre en los lotes de conjugado se determinó después respecto de una curva de calibración (de 0 a 50 µg/ml de proteína portadora). La proteína portadora libre en % se obtuvo como sigue: % de portador libre = (portador libre (µg/ml)/(concentración total de proteína portadora correspondiente medida por el ensayo de Lowry (µg/ml) * 100 %).

Estabilidad:

La distribución de peso molecular (K_{av}) y la estabilidad se midieron en una filtración de gel de HPLC-SEC (TSK 5000-PWXL) para conjugados mantenidos a 4 °C y almacenados durante 7 días a 37 °C.

25 La caracterización 10/11/13/14-valente se da en la Tabla 2 (véase el comentario en virtud de la misma).

Los conjugados de proteína pueden adsorberse sobre fosfato de aluminio y agruparse para formar la vacuna final.

Conclusión:

Se han producido conjugados inmunogénicos, que ya han demostrado ser componentes de una vacuna prometedora.

30

TABLA 2 – características de los conjugados

Conjugados	Dimensión de PS (Dax10 ³)	Relación de Portadora/PS	PS libre (ELISA)	Portadora libre	Antigenicidad de PS (ELISA)	Dimensión de conj. (kDa)
PS1-PD	349-382*	1,5-1,6	1,0 %-1,2 %	3,9 %-4,8 %	87 %-95 %	1499-1715
PS4-PD	93-100*	1,5-1,6	4,7-6,5 %	3,2 %-4,0 %	90 %-96 %	1303-1606
PS5-PD***	367-443	0,80	8,7-11,2 %	2,2 %-3,8 %	93 %-108 %	1998-2352
PS6A-PD	1100-1540	0,61	4,5 %	Sin hacer	45,9 %	Sin hacer
PS6B-PD***	1069-1391	0,7-0,8	1,3-1,6 %	<2,0 %	68 %-75 %	4778-5235
PS7F-PD	255-264*	1,1-1,2	< 1 %	<1,4 %	58 %	3907-4452
PS9V-PD	258-280*	1,3-1,5	< 1 %	<1,3 %	67 %-69 %	9073-9572
PS14-PD	232-241*	1,4	< 1 %	<1,5 %	70 %	3430-3779
PS18C-TT [†]	89-97*	2,2-2,4	1,5-2,2 %	<4 %	46 %-56 %	5464-6133
PS19A-Ply*	151	3,2	< 1 %		29 %	

Conjugados	Dimensión de PS (Dax10 ³)	Relación de Portadora/PS	PS libre (ELISA)	Portadora libre	Antigenicidad de PS (ELISA)	Dimensión de conj. (kDa)
PS19F-DT	133-143*	1,4-1,5	4,1 %-5,9 %	< 1,2 %-< 1,3 %	82 %-88 %	2059-2335
PS22F-PhtD*	159-167	2,17	5,8	Sin hacer	37 %	Sin hacer
PS22F-AHPhtD*	159-167	3,66-4,34	< 1%	Sin hacer	28-31 %	Sin hacer
PS23F-PD***	914-980	0,5	1,4-1,9 %	3,7 %-4,9 %	137 %-154 %	2933-3152
* Dimensión de PS después de la microfluidización del PS nativo						

Se hizo una vacuna 10-valente mezclando conjugados de serotipo 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (por ejemplo a una dosis de 1, 3, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1 µg de sacárido, respectivamente por dosis humana). Se realizó una vacuna 11-valente añadiendo, además, el conjugado de serotipo 3 de la Tabla 5 (por ejemplo a 1 µg de sacárido por dosis humana). Se realizó una vacuna 13-valente añadiendo además los conjugados de serotipos 19A y 22F anteriores (con 22F bien unido directamente a PhtD, o bien alternativamente unido mediante un ligador ADH) [por ejemplo a una dosis de 3 µg cada uno de los sacáridos por dosis humana]. Se puede realizar una vacuna 14-valente añadiendo además el conjugado de serotipo 6A anterior [por ejemplo a una dosis de 1 µg de sacárido por dosis humana].

10 Ejemplo 3: evidencia de que la inclusión de la proteína D de *Haemophilus influenzae* en una composición inmunogénica de la invención puede proporcionar protección mejorada contra la otitis media aguda (AOM).

Diseño del estudio.

El estudio usó una vacuna 11Pn-PD –que comprende los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F cada uno conjugado a la proteína D de *H. influenzae* (véase la Tabla 5 en el Ejemplo 4). Los sujetos se distribuyeron al azar en dos grupos para recibir cuatro dosis de bien la vacuna 11Pn-PD o bien de *Havrix* a aproximadamente 3, 4, 5 y 12-15 meses de edad. Todos los sujetos recibieron la vacuna *Infanrix-hexa* (DTPa-HBV-IPV/Hib) de GSK Biologicals concomitantemente a los 3, 4 y 5 meses de edad. *Infanrix-hexa* es una combinación de *Pediarix* e Hib mezclados antes de la administración. El seguimiento de eficacia para el análisis “según protocolo” se inició 2 semanas después de la administración de la tercera dosis de vacuna y continuó hasta los 24-27 meses de edad. El transporte nasofaríngeo de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* se evaluó en un subconjunto seleccionado de sujetos.

Se advirtió a los padres que consultaran al investigador si sus hijos estaban enfermos, tenían dolor de oído, perforación espontánea de la membrana del tímpano o secreción espontánea del oído. Si el investigador sospechó de un episodio de AOM, el niño se envió inmediatamente a un otorrinolaringólogo (especialista en ENT) para la confirmación del diagnóstico.

Un diagnóstico clínico de AOM se basó en el aspecto visual de la membrana del tímpano (es decir, rojez, hinchazón, pérdida del reflejo de luz) o en la presencia de efusión de fluido del oído medio (como se demostró por otoscopia simple o neumática o por microscopía). Además, al menos dos de los siguientes signos o síntomas han de estar presentes: dolor de oído, secreción de oído, pérdida auditiva, fiebre, letargo, irritabilidad, anorexia, vómitos, o diarrea. Si el especialista en ENT confirmó el diagnóstico clínico, se recogió una muestra de fluido del oído medio por timpanocentesis para ensayo bacteriológico.

Para los sujetos con visitas repetidas por sentirse mal, se consideró que se había iniciado un nuevo episodio de AOM si habían transcurrido más de 30 días desde el principio del episodio anterior. Además, se consideró que un episodio de AOM era un nuevo episodio bacteriano si la bacteria/el serotipo aislado difería del aislado anterior fuese el que fuese el intervalo entre los dos episodios consecutivos.

35 Resultados de los ensayos

Se reclutó un total de 4968 niños, 2489 en el grupo 11Pn-PD y 2479 en el grupo control. No hubo grandes diferencias en las características demográficas o los factores de riesgo entre los dos grupos.

Episodios clínicos y definición de caso de AOM

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

La tabla 3 presenta la eficacia protectora de la vacuna 11Pn-PD y de las dos vacunas 7-valentes ensayadas anteriormente en Finlandia (Eskola *et al* N Engl J Med 2001; **344**: 403–409 y Kilpi *et al* Clin Infect Dis 2003 37: 1155-64) contra cualquier episodio de AOM y contra AOM causados por serotipos neumococales diferentes, *H. influenzae*, *NTHi* y *M. catarrhalis*.

45 La reducción estadísticamente significativa y clínicamente relevante del 33,6 % de la carga de enfermedad AOM global se logró con 11 Pn-PD, sin tener en cuenta la etiología (tabla 3).

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

Otro descubrimiento importante en el estudio actual es la protección del 35,6 % proporcionada por la vacuna 11 Pn-PD contra la AOM causada por *H. influenzae* (y específicamente el 35,3 % de protección proporcionada por NTHi). Este descubrimiento es de mayor significación clínica, dada la mayor importancia de *H. influenzae* como una causa principal de la AOM en la era de vacunas de conjugados neumococales. En línea con la protección proporcionada contra la AOM, la vacuna 11 Pn-PD también redujo el transporte nasofaríngeo de *H. influenzae* después de la dosis de recuerdo en el segundo año de vida. Estos descubrimientos contrastan con observaciones anteriores realizadas en Finlandia donde, para ambas vacunas de conjugados neumococales 7-valentes, se observó un incremento en episodios de AOM debidos a *H. influenzae*, (Eskola *et al* y Kilpi *et al*) como evidencia de sustitución etiológica.

No se pudo establecer una clara correlación entre la protección contra los episodios de AOM debidos a niveles de Hi y de anticuerpos contra la proteína portadora D, puesto que las concentraciones de anticuerpos anti- IgG contra PD post-primarios en los vacunados con 11 Pn-PD, que permanecieron libres de episodios de Hi AOM, fueron esencialmente las mismas que los niveles de anticuerpos anti-IgG contra PD post-primarios medidos en los vacunados con 11 Pn-PD que desarrollaron al menos un episodio de Hi AOM durante el periodo de seguimiento de eficacia. Sin embargo, aunque no se pudo establecer ninguna correlación entre el impacto biológico de la vacuna y la inmunogenicidad anti-PD de IgG post-primaria, es razonable asumir que la proteína portadora PD, que está conservada en gran medida entre cepas de *H. influenzae*, ha contribuido en gran medida a la inducción de la protección contra Hi.

El efecto sobre la enfermedad AOM estaba acompañado por un efecto sobre el transporte nasofaríngeo que fue de magnitud similar para los neumococos de serotipos de la vacuna y para *H. influenzae* (Figura 1). Esta reducción del transporte nasofaríngeo de *H. influenzae* en los vacunados con conjugado-PD apoya la hipótesis de un efecto protector directo de la vacuna de conjugado-PD contra *H. influenzae*, incluso si la eficacia protectora no pudo correlacionarse con las respuestas inmunitarias anti-IgG contra PD según se miden por ELISA.

En un experimento siguiente se usó un modelo de otitis media de chinchilla con grupos de suero a partir de niños inmunizados con la formulación 11-valente de este ejemplo o con la vacuna de 10-valente del Ejemplo 2 (véase también la Tabla 1 y 2 y los comentarios en virtud de la misma). Ambos grupos inducen una reducción significativa del porcentaje de animales con otitis media respecto del grupo de suero preinmunitario. No hay diferencia significativa entre los grupos inmunitarios de 10 y 11 valencias. Esto demuestra que ambas vacunas tienen un potencial similar para inducir protección contra la otitis media causada por *H. influenzae* no tipificable en este modelo.

Tabla 3

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

NP = No publicado; N = número de sujetos en cohorte de eficacia ATP, n = número de episodios

*Serotipos neumococcales de vacuna: para 11Pn-PD = 11 serotipos, para Prevnar y 7v-Omp = 7 serotipos

MEF = Fluido del oído medio

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

5 El procedimiento ELISA de inhibición de 22F se basó esencialmente en un ensayo propuesto en 2001 por Concepción y Frasch y se refirió por Henckaerts et al., 2006, *Clinical and Vaccine Immunology* 13:356-360. En resumen, los polisacáridos neumococales purificados se mezclaron con albumina de suero humano metilado y se adsorbieron sobre placas de microtitulación de gran capacidad de unión Nunc Maxisorp™ (Roskilde, DK) una noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con suero fetal de ternera (FBS) al 10 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las muestras de suero se diluyeron en PBS que contiene FBS al 10 %, 10 µg/ml de polisacárido de pared celular (SSI) y 2 µg/ml de polisacárido neumococal de serotipo 22F (ATCC) y se diluyeron además sobre las placas de microtitulación con el mismo tampón. Se trató una referencia interna calibrada contra el suero estándar 89-SF usando las concentraciones de IgG específicas de serotipo en 89-SF de la misma manera y se incluyó en cada placa. Después de lavar, los anticuerpos unidos se detectaron usando anticuerpo monoclonal de IgG antihumano conjugado con peroxidasa (Stratech Scientific Ltd., Soham, Reino Unido) diluido en FBS al 10 % (en PBS) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. El color se desarrolló usando un kit de sustrato de inmunoensayo de enzima tetrametilbenzidina peroxidasa monocomponente listo para usar (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 0,18 M y la densidad óptica se leyó a 450 nm. Las concentraciones de IgG específicas de serotipo (en µg/ml) en las muestras se calcularon por puntos de densidad óptica de referencia dentro de límites definidos respecto de la curva de suero de referencia interna, que se modelizó por una ecuación logarítmica logística de 4 parámetros calculada con el software SoftMax Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El corte para el ELISA fue 0,05 µg/ml de IgG para todos los serotipos que tienen en cuenta el límite de detección y el límite de cuantificación.

Ensayo de opsonofagocitosis

25 En la convención de consulta WHO en junio de 2003, se recomendó usar un ensayo OPA como el expuesto en Romero-Steiner *et al* *Clin Diagn Lab Immunol* 2003 10 (6): páginas 1019-1024. Este protocolo se usó para ensayar la actividad OPA de los serotipos en los siguientes ensayos.

Preparación de conjugados

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

Las respuestas de anticuerpos antineumococales y la actividad OPA contra el serotipo 19F un mes después de la vacunación primaria con estas formulaciones 19F-DT se muestran en las Tablas 8 y 9 respectivamente.

35 La Tabla 10 muestra concentraciones de anticuerpos contra 22F-ELISA y porcentajes de sujetos que alcanzan el umbral de 0,2 µg/ml antes y después de la vacunación de recuerdo de polisacárido solo 23-valente.

40 Se mostró que la actividad opsonofagocítica mejoraba claramente mejorada para los anticuerpos inducidos con estas formulaciones 19F-DT como se demostró por los mayores niveles de seropositividad (títulos opsonofagocíticos ≥ 1:8) y GMT OPA un mes después de la vacunación primaria (Tabla 9). Un mes después de la vacunación de recuerdo de polisacárido solo de 23 valencias, la actividad opsonofagocítica de los anticuerpos 19F seguía siendo significativamente mejor para los niños iniciados con formulaciones 19F-DT (Tabla 11).

45 La tabla 12 presenta datos de inmunogenicidad después de una dosis de recuerdo de 11Pn-PD en niños pequeños previamente iniciados con conjugados 19F-DT o 19F-PD comparados con una cuarta dosis consecutiva de *Prevnar*®. Dados los casos de avance referidos después de la introducción de *Prevnar*® en los Estados Unidos, la actividad opsonofagocítica mejorada contra el serotipo 19F cuando está conjugado a la proteína portadora DT puede ser una ventaja para la vacuna candidata.

La tabla 13 proporciona datos de ELISA y OPA para el conjugado 19F-DT respecto del serotipo 19A de reactividad cruzada. Se ha descubierto que 19F-DT induce actividad OPA baja pero significativa contra 19A.

Tabla 4. Formulaciones de vacuna de conjugados neumococales usadas en estudios clínicos.

Formulación	Serotipo neumococal µg/proteína portadora											AI ³⁺ mg	
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F		
11Pn-PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	< 0,8
19F-DT Forma 1	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	10/DT	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	5/DT	≤ 0,35
19F-DT Forma 2	3/PD	2/PD	2/PD	3/PD	5/DT	3/PD	2/PD	2/PD	2/PD	2/PD	3/DT	5/DT	≤ 0,35

Formulación	Serotipo neumococal µg/proteína portadora											Al ³⁺ mg	
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F		
19F-DT Forma 3	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	3/PD	= 0,5

Tabla 5. Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de PS S. pneumoniae-conjugados de proteína D/TT/DT.

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

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

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

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

ES 2 614 938 T3

Serotipo	1 µfluido	3 µfluido	4 µfluido	5 µfluido	6B µfluido	7F Nativo
Disolución de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
Conc. de PD (mg/ml)	10,0	5,0	5,0	5,0 NaCl 2M	20 (DT) NaCl 2M	5,0
Relación inicial PD/PS (p/p)	1,2/1	1/1	1/1	1/1	1,5/1	1/1
Conc. de CDAP (mg/mg PS)	1,50	0,75	1,5	2	1,5	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9/9/9
Tiempo de acoplamiento	60 min.	60 min.	60 min.	60 min.	60 min.	60 min.
Serotipo	9V Nativo	14 Nativo	18C µfluido	19F µfluido	23F µfluido	
Conc. de PS (mg/ml)	1,75	2,5	5,0	9,0	10	
Disolución de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	
Conc. de proteína portadora (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	20 (DT)	10 (DT)	
Relación inicial proteína portadora/PS (p/p)	0,75/1	0,75/1	1,2/1	1,5/1	1,5/1	
Conc. de CDAP (mg/mg PS)	0,75	0,75	1,5	1,5	0,75	
pH _a =pH _c =pH _q	8,5/8,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	
Tiempo de acoplamiento	60 min.	60 min.	30 min.	60 min.	60 min.	

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

Serotipo	1 Nativo	3 µfluido	4 Nativo	5 Nativo	6B Nativo	7F µfluido
Conc. de PS (mg/ml)	1,5	2,0	2	7,5	5,5	5,0
Disolución de PS	NaCl 150 mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
Conc. de PD (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5	10
Relación inicial PD/PS (p/p)	0,7/1	1/1	1	1/1	1/1	1,2/1
Conc. de CDAP (mg/mg PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	8,8/8,8/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9

Tiempo de acoplamiento	60 min.	60 min.	45 min.	40 min.	60 min.	60 min.
Serotipo	9V µfluido	14 µfluido	18C Nativo	19F µfluido	19F µfluido	23F µfluido
Conc. de PS (mg/ml)	5,0	5,0	1,75	9,0	10,0	9,5
Disolución de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
Proteína portadora conc. (mg/ml)	10	10,0	5,0	20 (DT)	5,0 (PD)	10
Relación inicial proteína portadora/PS (p/p)	1,2/1	1,2/1	1,2/1	1,5/1	1,2/1	1/1
Conc. de CDAP (mg/mg PS)	0,5	0,75	0,75	1,5	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0
Tiempo de acoplamiento	60 min.	60 min.	45 min.	120 min.	120 min.	60 min.

Tabla 8. Porcentaje de sujetos con concentración de anticuerpo contra 19F ≥ 0,20 µg/ml y concentraciones de anticuerpo de media geométrica de anticuerpo contra 19F (GMC con 95 % CI; µg/ml) un mes después de la vacunación primaria con 1 µg de 19F-PD, 3 µg de 19F-DT o *Pprevnar* (2 µg 19F-CRM) (cohorte total).

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

[†] La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la tabla 4.

Tabla 9. Porcentaje de sujetos con título de 19F OPA ≥ 1:8 y GMT OPA 19F un mes después de la vacunación primaria con 1 µg de 19F-PD, 3 µg de 19F-DT o *Pprevnar* (2 µg de 19F-CRM) (cohorte total).

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

[†] La composición de las diferentes formulaciones se encuentra en la Tabla 4.

Tabla 10. Porcentaje de sujetos con concentración de anticuerpo 19F ≥ 0,20 µg/ml y GMC de anticuerpo 19F (µg/ml) antes de y un mes después de la vacunación de recuerdo de polisacárido solo de 23 valencias en niños iniciados con 1 µg de PD de 19F, 3 µg de DT de 19F o *Prevnar* (2 µg de CRM de 19F) (cohorte total).

Grupo primario	11Pn-PD&Di-002 (22F ELISA)					
	Antes de la vacunación de recuerdo			Un mes después de la vacunación de recuerdo PS de 23 valencias		
	N	% ≥ 0,20 µg/ml	GMC (µg/ml)	N	% ≥ 0,20 µg/ml	GMC (µg/ml)
		(95 % CI)	(95 % CI)		(95 % CI)	(95 % CI)
11Pn-PD	70	77,1 (65,6-86,3)	0,67 (0,45-0,98)	67	94,0 (85,4-98,3)	11,50 (7,76-17,03)
Forma 1 DT de 19F [†]	68	91,2 (81,8-96,7)	0,71 (0,54-0,94)	69	98,6 (92,2-100)	14,50 (10,47-20,07)
Forma 2 DT de 19F [†]	74	81,1 (70,3-89,3)	0,59 (0,43-0,80)	72	95,8 (88,3-99,1)	9,90 (6,74-14,54)
<i>Prevnar</i>	65	64,6 (51,8-76,1)	0,40 (0,27-0,60)	67	100 (94,6-100)	9,40 (6,95-12,71)

[†] La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la tabla 4.

Tabla 11. Porcentaje de sujetos con título de OPA 19F \geq 1:8 y GMT OPA 19F antes de y un mes después de la vacunación de recuerdo de polisacárido solo de 23 valencias en niños iniciados con 1 μ g de PD de 19F, 3 μ g de DT de 19F o *Prevnar* (2 μ g de CRM de 19F) (cohorte total).

Grupo primario	11Pn-PD&Di-002					
	Antes de la vacunación de recuerdo			Un mes después de la vacunación de recuerdo de PS de 23 valencias		
	N	% \geq 1:8	GMT	N	% \geq 1:8	GMT
		(95 % CI)	(95 % CI)		(95 % CI)	(95 % CI)
11Pn-PD	29	27,6 (12,7-47,2)	10,9 (5,0-23,7)	28	82,1 (63,1-93,9)	408,0 (157,3-1058,3)
Forma 1 DT de 19F [†]	19	47,4 (24,4-71,1)	18,1 (7,2-45,7)	18	94,4 (72,7-99,9)	1063,8 (386,6-2927,5)
Forma 2 DT de 19F [†]	27	33,3 (16,5-54,0)	8,5 (4,7-15,3)	28	100 (87,7-100)	957,6 (552,8-1659,0)
<i>Prevnar</i>	24	12,5 (2,7-32,4)	8,1 (3,4-19,6)	23	82,6 (61,2-95,0)	380,9 (133,2-1089,5)
[†] La composición de las diferentes formulaciones se muestra en la Tabla 4.						

Tabla 12. Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpos \geq 0.2 μ g/ml, OPA \geq 1:8 y GMC/GMT contra neumococos 19F un mes después de la vacunación de recuerdo de 11Pn-PD o *Prevnar* en niños iniciados con 1 μ g de PD de 19F, 3 μ g de DT de 19F o *Prevnar* (2 μ g de CRM de 19F) (cohorte total).

Grupo primario	11Pn-PD&Di-002					
	Ensayo 22F-ELISA			Ensayo OPA		
	N	% \geq 0,20 μ g/ml	GMC (μ g/ml)	N	% \geq 1:8	GMT
		(95 % CI)	(95 % CI)		(95 % CI)	(95 % CI)
11Pn-PD	70	100 (94,9-100)	4,52 (3,7-5,5)	21	100 (83,9-100)	255,6 (135,5-481,9)
Forma 1 DT de 19F [†]	66	98,5 (91,8-100)	3,45 (2,8-4,3)	23	95,7 (78,1-99,9)	374,0 (192,6-726,2)
Forma 2 DT de 19F [†]	70	98,6 (92,3-100)	3,80 (2,9-4,9)	29	96,6 (82,2-99,9)	249,1 (144,7-428,7)
<i>Prevnar</i>	69	97,1 (89,9-99,6)	2,56 (2,0-3,3)	31	96,8 (83,3-99,9)	528,7 (319,4-875,2)
[†] La composición de las diferentes formulaciones se muestra en la Tabla 4.						

Tabla 13. Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpos concentraciones \geq 0,2 μ g/ml, OPA \geq 1:8

y GMC/GMT contra neumococos 19A un mes después de la vacunación primaria con 1 µg de PD de 19F, 3 µg de DT de 19F o *Prevnar* (2µg de CRM de 19F) (cohorte total).

11Pn-PD&Di-001						
Ensayo 22F-ELISA				Ensayo OPA		
Grupo	N	% ≥ 0,20 µg/ml (95 % CI)	GMC (µg/ml) (95 % CI)	N	% ≥ 1:8 (95 % CI)	GMT (95 % CI)
Forma 11Pn-PD	45	28,9 (16,4-44,3)	0,09 (0,07-0,11)	52	7,7 (2,1-18,5)	5,2 (4,0-6,8)
Forma 2DT de 19F [†]	51	29,4 (17,5-43,8)	0,11 (0,08-0,16)	59	27,1 (16,4-40,3)	12,4 (7,6-20,3)
<i>Prevnar</i>	55	18,2 (9,1-30,9)	0,10 (0,08-0,12)	61	3,3 (0,4-11,3)	4,6 (3,8-5,6)

[†]La composición de las diferentes formulaciones se muestra en la Tabla 4.

5 **Ejemplo 5: Experimentos adyuvantes en modelos preclínicos: impacto sobre la inmunogénicidad de conjugados de polisacáridos neumococales 11-valente en monos Rhesus ancianos**

Para optimizar la respuesta provocada para conjugar vacunas neumococales en la población anciana, GSK formuló una vacuna de conjugado polisacárido (PS) 11-valente con un nuevo adyuvante, Adyuvante C –véase más adelante.

10 Los grupos de 5 monos rhesus ancianos (14 a 28 años de edad) se inmunizaron intramuscularmente (IM) en los días 0 y 28 con 500 µl de bien los conjugados PS 11-valentes adsorbidos en 315 µg de AlPO4 o bien los conjugados PS 11-valentes mezclados con el Adyuvante C.

15 En ambas formulaciones de vacuna, los conjugados PS 11-valentes estaban compuestos cada uno de los siguientes conjugados PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-PD, PS19F-PD, PS23F-DT y PS6B-DT. La vacuna usada era de 1/5 de dosis de la dosis humana de la vacuna (5 µg de cada sacárido por dosis humana excepto para 6B [10 µg]) conjugada según las condiciones de la Tabla 6 (Ejemplo 4), excepto 19F se realizó según las siguientes condiciones de procedimiento CDAP:sacárido dimensionado a 9 mg/ml, PD a 5 mg/ml, una relación inicial PD/PS de 1,2/1, una concentración de CDAP de 0,75 mg/mg PS, pHa=pHc=pHq 9,0/9,0/9,0 y un tiempo de acoplamiento de 60 min.

20 Los niveles de IgG de ELISA anti-PS y los títulos de opsonofagocitosis se dosificaron en sueros recogidos el día 42. Las frecuencias de células B de memoria anti-PS3 se midieron por Elispot a partir de los glóbulos rojos periféricos recogidos el día 42.

25 Según los resultados mostrados más adelante, el adyuvante C mejora significativamente la inmunogenicidad de los conjugados PS 11-valentes respecto de los conjugados con AlPO4 en los monos ancianos. El nuevo adyuvante mejora las respuestas IgG a PS (Figura 1) y los títulos de anticuerpos de opsonofagocitosis (Tabla 14). También hay evidencia de apoyo de que la frecuencia de las células B de memoria específicas de PS3 se incrementa por el uso del adyuvante C (Figura 2).

Tabla 14. Inmunogenicidad de conjugados en monos Rhesus ancianos (títulos de opsonofagocitosis después de II).

	PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PF7F	PS9V	PS14	PS18C	PS19	PS23F
AIPO4	< 8	5	< 8	5	< 8	16	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8
11- valente	8	181	64	49	64	4096	42	37	169	64	< 64
	14 días después de II										
Ady-C	5	9	< 8	5	8	37	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8
11- valente	776	1351	891	676	6208	16384	111	161	7132	2048	< 64
	14 días después de II										

Elispot de células B

El principio del ensayo se fundamenta en el hecho de que las células B de memoria maduran en células plasmáticas *in vitro* después de su cultivo con CpG después de 5 días. Las células plasmáticas específicas de antígeno generadas *in vitro* pueden detectarse fácilmente y por lo tanto enumerarse usando el ensayo Elispot de células B. El número de células plasmáticas específicas refleja la frecuencia de las células B de memoria al principio del cultivo.

En resumen, las células plasmáticas generadas *in vitro* se incuban en placas de cultivo revestidas con antígeno. Las células plasmáticas específicas de antígeno forman puntos de anticuerpo/antígeno que se detectan por procedimiento inmunoenzimático convencional y se enumeran como células B de memoria.

En el presente estudio, los polisacáridos se han usado para revestir placas de cultivo para enumerar las células B de memoria respectivas. Los resultados se expresan como una frecuencia de células B de memoria específicas de PS en un millón de células B de memoria.

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

Ejemplo 6. Efectividad de neumolisina detoxificada (dPly) como un portador proteico para mejorar la inmunogenicidad del PS 19F en ratones Balb/c jóvenes

Los grupos de 40 ratones Balb/c hembra (de 4 semanas de edad) se inmunizaron IM los días 0, 14 y 28 con 50 µl de bien PS solo tetravalente o bien PS conjugado con dPly tetravalente, ambos mezclados con Adyuvante C.

20 Ambas formulaciones de vacunas se componían de 0,1 µg (cantidad de sacárido) de cada uno de los siguientes PS: PS8, PS12F, PS19F y PS22F.

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

25 La respuesta anti-PS19F, mostrada como un ejemplo en la figura 3, se mejoró en gran medida en los ratones a los que se dio conjugados de dPly tetravalente comparados con los ratones inmunizados con el PS solo. La misma mejora se observó para las respuestas IgG anti-PS8, 12F y 22F (datos no mostrados).

Ejemplo 7. Efectividad de la proteína de tríada de polihistidina neumococal D (PhtD) como un portador proteico para mejorar la inmunogenicidad de PS 22F en ratones Balb/c jóvenes

Los grupos de 40 ratones Balb/c hembra (de 4 semanas de edad) se inmunizaron IM los días 0, 14 y 28 con 50 µl de bien PS solo tetravalente o bien PS conjugado con PhtD tetravalente, ambos mezclados con Adyuvante C.

30 Ambas formulaciones de vacunas se componían de 0,1 µg (cantidad de sacárido) de cada uno de los siguientes PS: PS8, PS12F, PS19F y PS22F

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

35 La respuesta anti-PS22F, mostrada como un ejemplo en la figura 4, se mejoró en gran medida en los ratones a los que se dio conjugados de PhtD tetravalente comparado con los ratones inmunizados con el PS solo. La misma mejora se observó para las respuestas de IgG anti-PS8, 12F y 22F (datos no mostrados).

Ejemplo 8. Inmunogenicidad en ratones C57Bl mayores de PS conjugados 13-valentes que contienen 19A-dPly y 22F-PhtD

40 Los grupos de 30 ratones C57Bl ancianos (< 69 semanas de edad) se inmunizaron IM los días 0, 14 y 28 con 50 µl de bien conjugados de PS 11-valentes o bien conjugados de PS 13-valentes, ambos mezclados con Adyuvante C (véase más adelante).

45 La formulación de vacuna 11-valente estaba compuesta de 0,1 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véanse Tabla 1 y comentario sobre la vacuna 11-valente mencionada a continuación de la Tabla 2). La formulación de vacuna 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados de PS19A-dPly y conjugados de PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna de 13-valente discutido bajo la Tabla 2 [usando 22F directamente conjugado]). En los grupos 2 y 4 el portador de neumolisina se detoxificó con tratamiento de GMBS, en el grupo 3 y 5 se hizo con formaldehído. En los grupos 2 y 3 se uso PhtD para conjugar PS 22F, en los grupos 4 y 5 se usó una fusión de PhtD_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6 se conjugó 19A a toxoide de la difteria y 22F a la proteína D.

50 Los niveles de IgG de ELISA anti-PS19A y anti-22F se dosificaron en sueros individuales recogidos el día 42. La respuesta de IgG de ELISA generada contra el otro PS se midió en sueros agrupados.

55 19A-dPly y 22F-PhtD administrados en la formulación de vacuna de conjugado 13-valente se mostraron inmunogénicos en ratones C57Bl viejos (Tabla 15). La respuesta inmunitaria inducida contra el otro PS no tuvo un impacto negativo en los ratones a los que se les dio la formulación 13-valente comparado con los inmunizados con la formulación 11-valente.

Tabla 15. Inmunogenicidad en ratones C57Bl viejos (niveles de IgG después de III).

ES 2 614 938 T3

Ratones viejos C57 negros							
ELISA		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
		11V 0,1 µg/50µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1 µg/50µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1 µg/50µl Ady C	11V 19 ^a -dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1 µg/50µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1 µg/50µl Ady C	11V 19A-DT 22F-PD 0,1 µg/50µl Ady C
1	Grupo Medio	19,30	20,20	24,40	12,80	12,10	13,60
3	Grupo Medio	6,32	4,84	5,21	6,74	2,38	2,54
4	Grupo Medio	60,9	67,1	51,4	47,4	45,5	41,1
5	Grupo Medio	1,34	3,81	3,06	2,75	1,26	1,23
6B	Grupo Medio	4,41	4,12	5,88	1,58	2,31	5,64
7F	Grupo Medio	0,83	0,81	1,65	1,98	0,89	0,99
9V	Grupo Medio	13,8	23,7	20,0	13,1	15,5	9,6
14	Grupo Medio	25,73	42,96	34,12	32,53	23,97	15,60
18C	Grupo Medio	13,4	20,1	11,9	9,1	8,3	8,4
19F	Grupo Medio	57,5	90,0	63,8	36,5	47,0	69,1

Ratones viejos C57 negros							
ELISA		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
23F	Grupo Medio	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19A	GMC	0,06	0,09	0,25	0,08	0,23	0,19
	IC	0,04-0,1	0,05-0,14	0,15-0,41	0,06-0,12	0,14-0,38	0,09-0,3
	% suero	33 %	47 %	83 %	53 %	80 %	73 %
22F	GMC	NR	5,81	3,76	0,54	0,85	2,02
	IC		3,2-10,6	1,8-7,9	0,3-1,1	0,4-1,7	1,2-3,4
	% suero	0 %	97 %	90 %	77 %	87 %	97 %

Ejemplo 9, Inmunogenicidad en ratones jóvenes Balb/c de conjugados de PS 13-valentes que contienen 19A-dPly y 22F-PhtD

5 Los grupos de 30 ratones Balb/c jóvenes (4 semanas de edad) se inmunizaron IM los días 0, 14 y 28 con 50 µl de bien conjugados de PS 11-valentes o bien conjugados de PS 13-valentes, ambos mezclados con Adyuvante C (véase más adelante).

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

15 Los niveles de IgG de ELISA anti-PS19A y 22F se dosificaron en sueros individuales recogidos el día 42. La respuesta de IgG de ELISA generada contra el otro PS se midió en sueros agrupados.

20 Se muestran 19A-dPly y 22F-PhtD administrados en la formulación de vacuna de conjugado 13-valente en ratones inmunogénicos Balb/c jóvenes (Tabla 16). La respuesta inmunitaria inducida contra el otro PS no tuvo un impacto negativo en los ratones a los que se les dio la formulación 13-valente comparado con los inmunizados con la formulación 11-valente.

Tabla 16. Inmunogenicidad de PS en ratones Balb/c jóvenes (niveles de IgG después de III).

Ratones BalbC							
ELISA		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
		11V	11V	11V	11V	11V	11V
			19A-dPly gmb	19A-dPly formol	19A-dPly gmb	19A-dPly formol	19A-DT
			22F-PhtD	22F-PhtD	22F-PhtD-E	22F-PhtD-E	22F-PD
		0,1 µg/50 µl	0,1 µg/50 µl	0,1 µg/50 µl	0,1 µg/50 µl	0,1 µg/50 µl	0,1 µg/50 µl
		Ady C	Ady C	Ady C	Ady C	Ady C	Ady C
1	Grupo Medio	131,70	101,20	83,00	82,40	67,90	85,50
3	Grupo	21,85	10,38	12,53	8,83	8,73	14,98

Ratones BalbC							
ELISA		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	Medio						
4	Grupo	147,4	127,0	104,4	95,0	113,6	114,2
	Medio						
5	Grupo	21,38	20,29	18,26	18,95	18,02	23,04
	Medio						
6B	Grupo	1,97	4,76	3,72	2,35	1,43	1,05
	Medio						
7F	Grupo	7,69	4,58	4,77	4,24	3,92	3,94
	Medio						
9V	Grupo	30,1	30,7	26,5	21,4	23,4	28,3
	Medio						
14	grupo	28,78	27,67	26,23	21,54	24,34	13,73
	Medio						
18C	Grupo	53,4	52,37	46,5	57,8	47,8	75,8
	Medio						
19F	Grupo	186,6	157,7	169,3	178,9	181,9	223,2
	Medio						
23F	Grupo	4,98	3,9	5,11	0,57	3,13	4,57
	Medio						
19A	GMC	0,4	32,8	25,1	21,6	18,9	23,5
	IC	0,2-0,6	26,4-40,7	20,6-30,6	17,5-26,7	15,1-23,5	19,5-28,5
	% suero	93 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
22F	GMC	NR	3,99	3,76	6,27	8,70	18,76
	IC		1,9-8,42	1,8-8	3,8-10,4	5,4-13,9	15,2-23,1
	% suero	0 %	93 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Ejemplo 10. Inmunogenicidad en cobayas de conjugados PS 13-valentes que contienen 19A-dPly y 22F-PhtD

5 Los grupos de 20 cobayas jóvenes (Hartley Strain; 5 semanas de edad) se inmunizaron IM en los días 0, 14 y 28 con 125 µl de bien conjugados de PS 11-valentes o bien conjugados de PS 13-valentes, ambos mezclados con Adyuvante C (véase más adelante).

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

15 Los niveles de IgG de ELISA anti-PS19A y 22F se dosificaron en sueros individuales recogidos el día 42. La respuesta de IgG ELISA generada al otro PS se midió en sueros agrupados.

Tabla 17. Inmunogenicidad de PS en ratones Balb/c jóvenes (niveles de IgG después de III).

ES 2 614 938 T3

Cobayas						
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V	11V	11V	11V	11V	11V
		19A-dPly gmbS	19A-dPly formol	19A-dPly gmbS	19A-dPly formol	19A-DT
		22F-PhtD	22F-PhtD	22F-PhtD-E	22F-PhtD-E	22F-PD
	0,1 µg/50µl	0,1 µg/50µl	0,1 µg/50µl	0,1 µg/50µl	0,1 µg/50µl	0,1 µg/50µl
	Ady C	Ady C	Ady C	Ady C	Ady C	Ady C
1 Grupo Medio	78,00	77,21	76,15	68,77	68,59	81,04
3 Grupo Medio	7,75	9,31	12,73	7,94	4,75	9,59
4 Grupo Medio	130,7	94,4	132,6	166,8	85,0	101,3
5 Grupo Medio	109,10	117,10	110,70	158,40	74,10	100,40
6B grupo Medio	3,14	4,26	14,4	7,63	6,3	7,52
7F Grupo Medio	154,2	216,0	240,0	181,0	142,0	179,1
9V Grupo Medio	90,69	105,45	98,20	93,45	54,12	73,05
14 Grupo Medio	71,19	77,18	46,53	59,67	38,47	53,69
18C Grupo Medio	109,4	122,3	137,1	79,9	73,7	83,1
19F Grupo Medio	73,9	102,5	112,2	75,5	62,3	72,1
23F grupo Medio	19,19	30,74	29,44	31,52	19,13	24,94
19A GMC	0,4	25,58	41,49	14,25	27,49	6,74
IC	0,24-0,68	12-54,5	24,4-70,5	5,9-34,6	16,6-45,4	4-11,3
% suero	75 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
22F GMC	0,12	2,51	3,67	45,74	30,68	96,38
IC	0,09-0,16	0,94-6,73	1,59-8,42	29,3-71,4	17-53,3	73,5-126,4
% suero	10 %	95 %	95 %	100 %	100 %	100 %

Ejemplo 11: formulaciones que se hicieron y se sometieron a ensayos

a) Las siguientes formulaciones se hacen (usando la vacuna 13-valente de la Tabla 1 y el serotipo 3 de la Tabla 5 – véase el comentario sobre la vacuna 14-valente discutido a continuación de la Tabla 2 [usando 22F directamente conjugado o a través de un ligador de ADH]). Los sacáridos se formulan con fosfato de aluminio y 3D-MPL como se muestra más adelante.

5

14V 25 µg de MPL						14V 10 µg de MPL					
Suma del contenido de aluminio de BAC -> FF						Suma del contenido de aluminio de BAC -> FF					
Por dosis:						Por dosis:					
PS	Portador	µg de PS	µg de MPL	Relación de PS/AL 1x	µg de Al	PS	Portador	µg de PS	µg de MPL	Relación de PS/AL 1x	µg de Al
1	PD	1		10	10	1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10	3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30	4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10	5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10	6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10	6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10	7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10	9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10	14	PD	1		10	10
18C	TT _{AH}	3		15	45	18C	TT _{AH}	3		15	45
19A	dPly	3		10	30	19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30	19F	DT	3		10	30
22F	PhTD	3		10	30	22F	PhTD	3		10	30
23F	PD	1		10	10	23F	PD	1		10	10
BAC/MPL 50/200			25	4	100	BAC/MPL 50/200			10	4	40
Contenido de aluminio de FF				Suma =	355	Contenido de aluminio de FF				Suma =	295

b) La misma formulación de sacárido es adyuvada con cada uno de los siguientes adyuvantes:

-en la siguiente tabla se muestra la concentración de los componentes de emulsión por dosis de 500 µl.

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

10

	Adyuvante A4	Adyuvante A5	Adyuvante A6	Adyuvante A7
Ingredientes	250 µl de emulsión o/w	250 µl de emulsión o/w	125 µl de emulsión o/w	50 µl de emulsión o/w
Alfa tocoferol	11,88 mg	11,88 mg	5,94 mg	2,38 mg
Escualeno	10,7 mg	10,7 mg	5,35 mg	2,14 mg

Tween 80	4,85 mg	4,85 mg	2,43 mg	0,97 mg
3D-MPL	50 µg	25 µg	25 µg	10 µg

c) Los sacáridos también son formulados con dos adyuvantes basados en liposomas:

Composición de Adyuvante B1

Cualitativa Cuantitativa (por dosis de 0,5 ml)

Liposomas:

- 5 -DOPC 1 mg
- colesterol 0,25 mg
- 3DMPL 50 µg
- QS21 50 µg
- Tampón KH₂PO₄ 1 3,124 mg
- 10 Tampón Na₂HPO₄ 1 0,290 mg
- NaCl 2,922 mg
- (100 mM)
- WFI c.s. para 0,5 ml de disolvente
- pH 6,1
- 15 1. Concentración total de PO₄ = 50 mM

Composición de Adyuvante B2

Cualitativa Cuantitativa (por dosis de 0,5 ml)

Liposomas:

- DOPC 0,5 mg
- 20 -colesterol 0,125 mg
- 3DMPL 25 µg
- QS21 25 µg
- Tampón KH₂PO₄ 1 3,124 mg
- Tampón Na₂HPO₄ 1 0,290 mg
- 25 NaCl 2,922 mg
- (100 mM)
- WFI c.s. para 0,5 ml de disolvente
- pH 6,1

30 d) Los sacáridos también se formulan con el adyuvante C (véanse anteriormente otras composiciones donde este adyuvante se ha usado):

Cualitativa Cuantitativa (por dosis de 0,5 ml)

Emulsión de aceite en agua: 50 µl

- escualeno 2,136 mg
- α-tocoferol 2,372 mg
- 35 -Tween 80 0,97 mg
- colesterol 0,1 mg
- 3DMPL 50 µg
- QS21 50 µg

Tampón KH_2PO_4 1 0,470 mg

Tampón Na_2HPO_4 1 0,219 mg

NaCl 4,003 mg

(137 mM)

5 KCl 0,101 mg

(2,7 mM)

WFI c.s. para 0,5 ml de disolvente

pH 6,8

10 **Ejemplo 12. Impacto de química de conjugación sobre la inmunogenicidad de conjugados de 22F-PhtD en ratones Balb/c**

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

15 PS 18C se conjugó al toxoide del tétanos, 19F al toxoide de la difteria, 19A al Ply formol-detoxificado, 22F al PhtD y los otros PS al PD.

Se compararon dos formulaciones, constituidas bien por 22F-PhtD preparado por química de CDAP directa o bien por 22F-AH-PhtD (PS ADH-derivatizado). Véase el Ejemplo 2, Tabla 1 y el comentario bajo la Tabla 2 para las características de la vacuna 13-valente hecha bien con 22F conjugado directamente o bien por un espaciador ADH. Las formulaciones de vacuna se suplementaron con el adyuvante C.

20 Los niveles de IgG anti-PS22F ELISA y los títulos de opsonofagocitosis se midieron en sueros recogidos en el día 42.

Se mostró 22F-AH-PhtD mucho más inmunogénico que 22F-PhtD en términos tanto de niveles IgG (figura 5) como de títulos opsonofagocíticos (figura 6).

25 **Ejemplo 13, impacto de nuevos adyuvantes sobre la inmunogenicidad de conjugados PS de cápsula de *Streptococcus pneumoniae***

Grupos de 40 ratones Balb/c hembras se inmunizaron por vía IM los días 0, 14 y 28 con formulaciones de PS 13-valentes que contienen PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F (dosis: 0,3 µg de sacárido/PS para PS 4, 18C, 19A, 19F y 22F y 0,1 µg/PS para los otros PS).

30 PS 18C se conjugó al toxoide del tétanos, 19F al toxoide de la difteria, 19A al Ply formol-detoxificado, 22F al PhtD y los otros PS al PD. Véase el Ejemplo 2, Tabla 1 y el comentario bajo la Tabla 2 para las características de la vacuna 13-valente hecha con 22F conjugado directamente.

Se compararon cuatro formulaciones suplementadas bien con AlPO_4 , bien con adyuvante A1, bien con adyuvante A4 o bien con adyuvante A5.

35 Los niveles de IgG de ELISA anti-PS, Ply, PhtD y PD se midieron en sueros recogidos el día 42 y agrupados por grupos. La siguiente relación se calculó para cada antígeno: nivel de IgG inducido con el nuevo adyuvante ensayado/nivel de IgG inducido con AlPO_4 .

Todos los nuevos adyuvantes ensayados mejoraron al menos 2 veces las respuestas inmunitarias a los conjugados 13-valentes comparados con la formulación AlPO_4 clásica (figura 7).

40 **Ejemplo 14, eficacia protectora de un conjunto PhtD/Ply detoxificado en un modelo de neumonía neumococal del mono**

Grupos de 6 monos rhesus (de 3 a 8 años de edad), seleccionados como aquellos que tienen los menores niveles de anticuerpos anti-19F preexistentes, se inmunizaron intramuscularmente los días 0 y 28 bien con conjugados PS 11-valentes (es decir 1 µg de PS 1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F y 3 µg de PS 4, 18C y 19F) o bien con PhtD (10 µg) + Ply formol-detoxificado (10 µg) o bien con el adyuvante solo.

45 PS 18C se conjugó al toxoide del tétanos, 19F al toxoide de la difteria y los otros PS a PD. Véase el Ejemplo 2, Tabla 1 y el comentario bajo la Tabla 2 para las características de la vacuna 11-valente. Todas las formulaciones se suplementaron con el adyuvante C.

50 Los neumococos de tipo 19F ($5 \cdot 10^8$ ufc) se inocularon en el pulmón derecho el día 42. Se contaron las colonias en los lavados broncoalveolares los días 1, 3 y 7 después de la inoculación. Los resultados se expresaron como el número de animales por grupo, bien muertos, bien con el pulmón colonizado o bien limpios en el día 7 después de la inoculación.

Como se muestra en la figura 8, se obtuvo una buena protección cercana a la significación estadística (a pesar del bajo número de animales usado) con conjugados 11-valente y el conjunto PhtD+dPly ($p < 0,12$, Ensayo exacto de

Fisher) comparado con el grupo del adyuvante solo.

Ejemplo 15, impacto de química de conjugación sobre la respuesta de anticuerpo anti-PhtD y la eficacia protectora contra una inoculación de tipo 4 inducida por los conjugados 22F-PhtD

- 5 Grupos de 20 hembras de ratón OF1 se inmunizaron por vía intramuscular los días 0 y 14 con 3 µg de bien 22F-PhtD (preparado por química de CDAP directa) o bien 22F-AH-PhtD (PS ADH-derivatizado), o bien el adyuvante solo. Ambos conjugados 22F monovalentes se realizaron por los procedimientos del Ejemplo 2 (véase también la Tabla 1 y la Tabla 2). Cada formulación se suplementó con adyuvante C.

Los niveles de IgG de ELISA anti-PhtD se midieron en sueros recogidos el día 27.

- 10 Los ratones se inocularon intranasalmente con $5 \cdot 10^6$ ufc de neumococos de tipo 4 el día 28 (es decir, un serotipo neumococal no potencialmente cubierto por el PS presente en la formulación de vacuna ensayada). La mortandad inducida se vigiló hasta el día 10 después de la inoculación.

22F-AH-PhtD indujo una respuesta IgG anti-PhtD significativamente mayor y una mejor protección contra la inoculación de tipo 4 que 22F-PhtD.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica de *Streptococcus pneumoniae* que comprende 10 o más sacáridos capsulares de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* serotipos que están conjugados a una proteína portadora y que comprenden 3 o más proteínas portadoras diferentes, en la que la composición comprende:
 - 5 el sacárido capsular del serotipo 19F conjugado al toxoide de la difteria (DT);
 - el sacárido capsular del serotipo 18C conjugado al toxoide tetánico (TT);
 - los sacáridos capsulares de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados a proteína D de *Haemophilus influenzae*.
2. Una composición inmunogénica según la reivindicación 1 en la que el sacárido capsular 19F está conjugado a la proteína portadora.
3. Una composición inmunogénica según la reivindicación 1 en la que el sacárido capsular 19F está conjugado a la proteína portadora por un ligador.
4. Una composición inmunogénica según la reivindicación 3 en la que el ligador es bifuncional.
5. La composición inmunogénica de la reivindicación 3 o 4 en la que el ligador es ADH.
6. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 3-5, en la que el ligador está fijado a la proteína portadora por química carbodiimídica, o usando química de EDAC.
7. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el sacárido 19F está conjugado a la proteína portadora o al ligador usando química de CDAP.
8. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la relación de proteína portadora respecto del sacárido 19F está entre 5:1 y 1:5, 4:1 y 1:1 o 2:1 y 1:1, o 1.5:1 y 1.4:1 (p/p).
9. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la dimensión media (por ejemplo M_p) del sacárido 19F está por encima de 100 kDa.
10. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la dosis del sacárido conjugado 19F está entre 1 y 10 μ g, 1 y 5 μ g, o 1 y 3 μ g del sacárido.
11. Una composición inmunogénica según la reivindicación 1 en la que cada sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* está conjugado a una proteína portadora independientemente seleccionada del grupo que consiste en toxoide tetánico (TT), toxoide de la difteria (DT), CRM197, fragmento C de toxoide tetánico (TT), PhtD, fusiones de PhtDE, pneumolisina detoxificada y proteína D.
12. Una composición inmunogénica según cualquier reivindicación anterior que comprende además el serotipo 6A y/o 15B.
13. Una composición inmunogénica según cualquier reivindicación anterior que comprende además el serotipo 19A.
14. Una composición inmunogénica según cualquier reivindicación anterior que comprende además el serotipo 22F.
15. Una composición inmunogénica según cualquier reivindicación anterior que comprende además el serotipo 12F.
16. Una composición inmunogénica según cualquier reivindicación anterior que comprende pneumolisina como proteína libre o portadora.
17. Una composición inmunogénica según cualquier reivindicación anterior que comprende una proteína de la familia de la tríada de polihistidina (PhtX), seleccionada de PhtA, PhtB, PhtD o PhtE, una proteína de fusión de PhtBD o una proteína de fusión de PhtDE como proteína libre o portadora.
18. La composición inmunogénica según cualquier reivindicación anterior que comprende además un coadyuvante.
19. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
20. Un procedimiento de fabricación de la vacuna de acuerdo con la reivindicación 19 que comprende la etapa de mezclar la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-18 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
21. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-18 o la vacuna de la reivindicación 19 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedad causada por infección con *Streptococcus pneumoniae*.
22. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-18 o la vacuna de la reivindicación 19 para su uso de acuerdo con la reivindicación 21 en la que la enfermedad es: una de las dos o ambas de neumonía o enfermedad

neumococal invasiva (ENI) de personas ancianas, exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), otitis media de niños, meningitis y/o bacteremia de niños, o neumonía y/o conjuntivitis de niños.

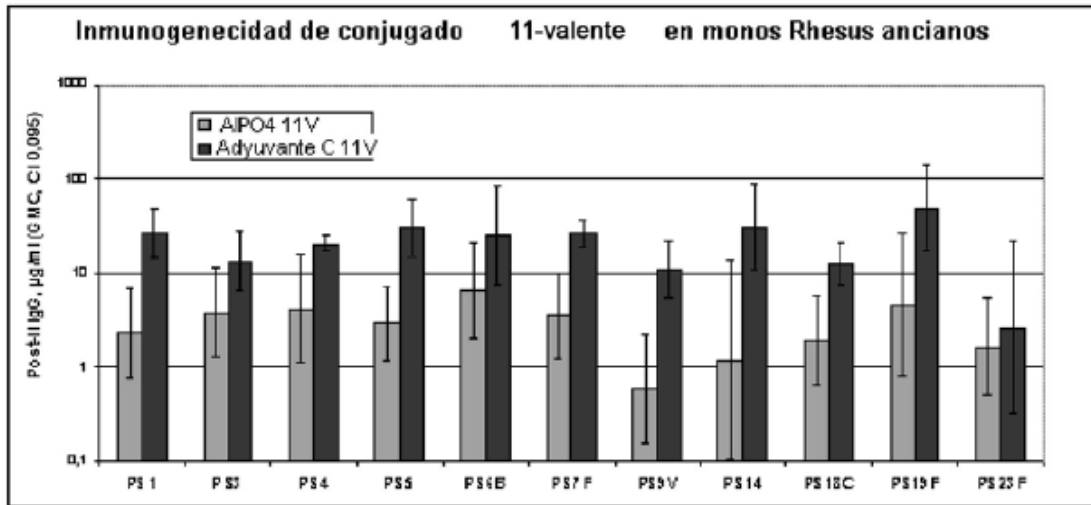


Figura 1. Inmunogenicidad del conjugado en monos Rhesus ancianos (niveles de IgG anti-PS después de II)

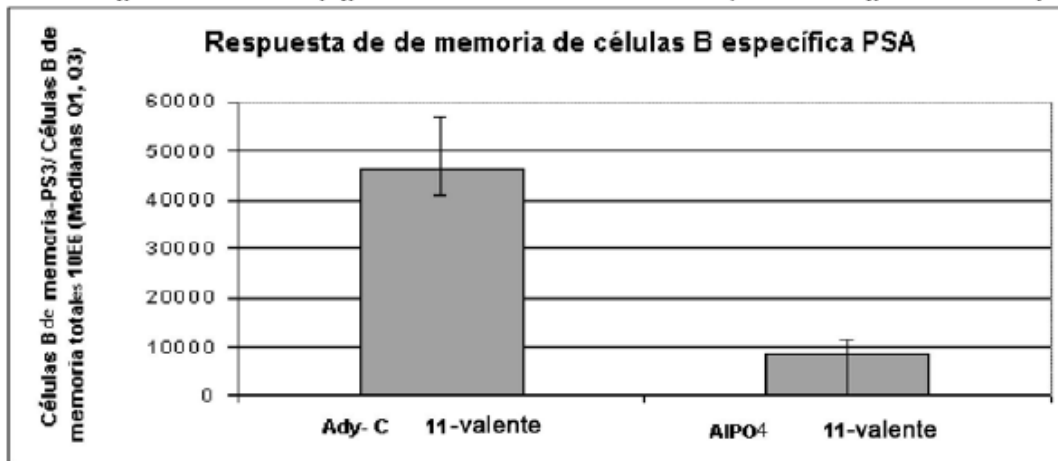


Figura 2. Inmunogenicidad del conjugado en monos Rhesus ancianos (frecuencias de células B de memoria anti-PS3 después de II)

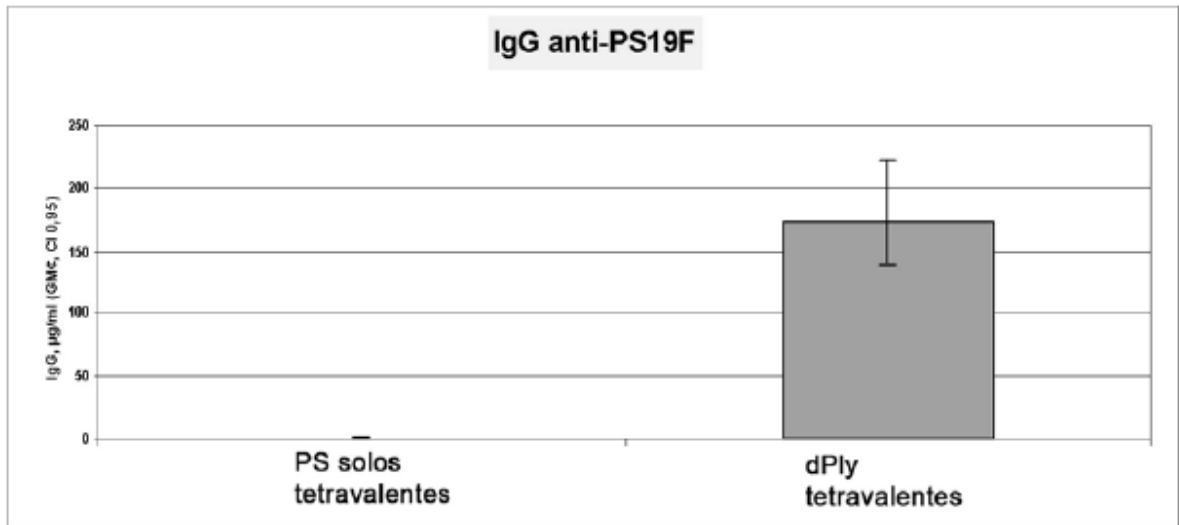


Figura 3. Inmunogenicidad de PS19F en ratones Balb/c (niveles de IgG después de III).

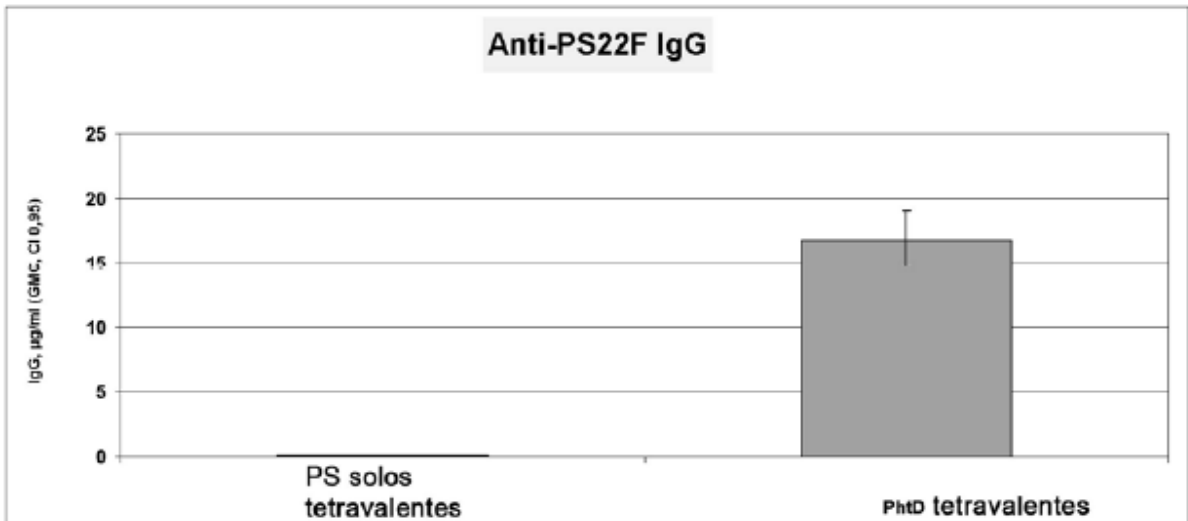


Figura 4. Inmunogenicidad de PS22F en ratones Balb/c (niveles de IgG después de III)

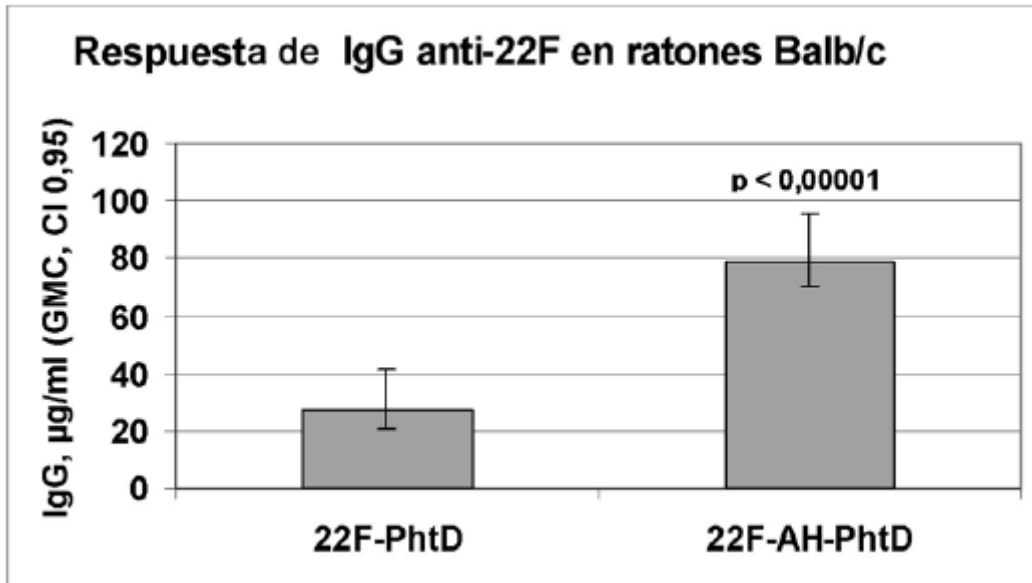


Figura 5. Niveles de anticuerpo de IgG anti-PS en suero

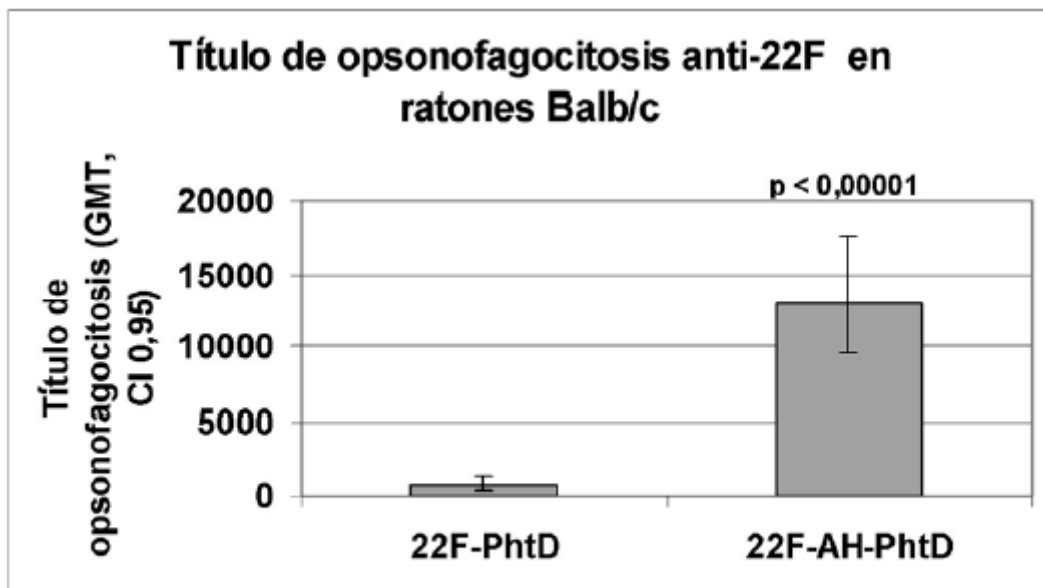


Figura 6. Título de opsonofagocitosis

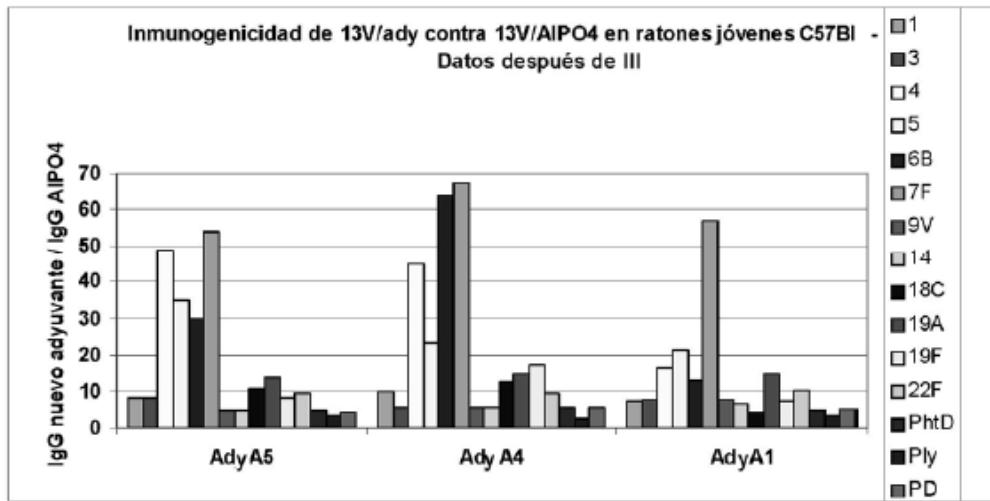


Figura 7. Comparación de respuestas de IgG inducidas con nuevos adyuvantes con la respuesta provocada con AIPO₄

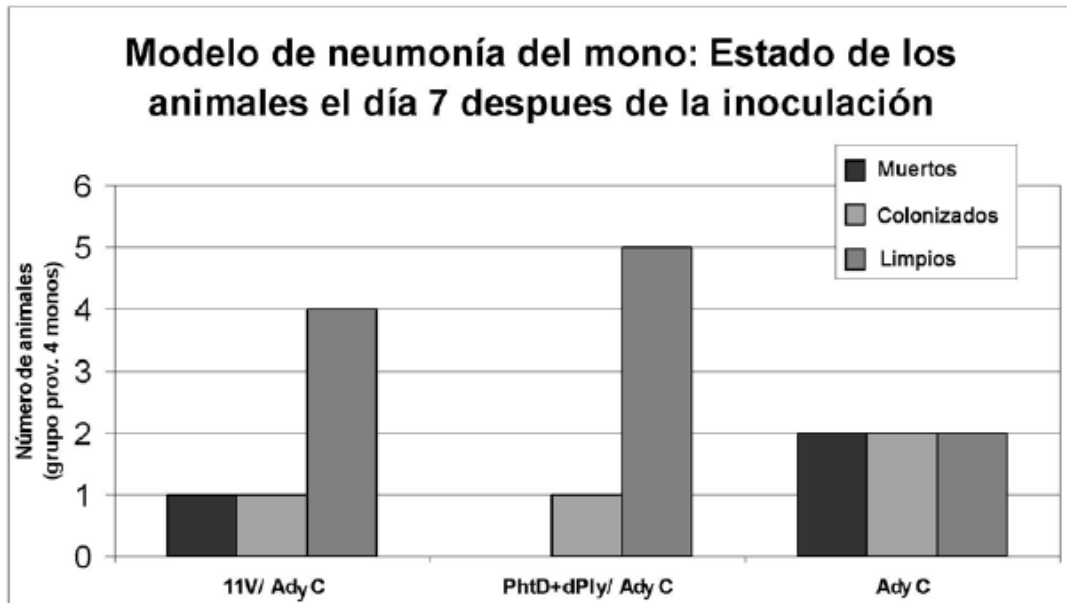


Figura 8. Eficacia protectora del conjunto de proteínas PhtD + dPly contra la colonización pulmonar de tipo 19F en los monos Rhesus

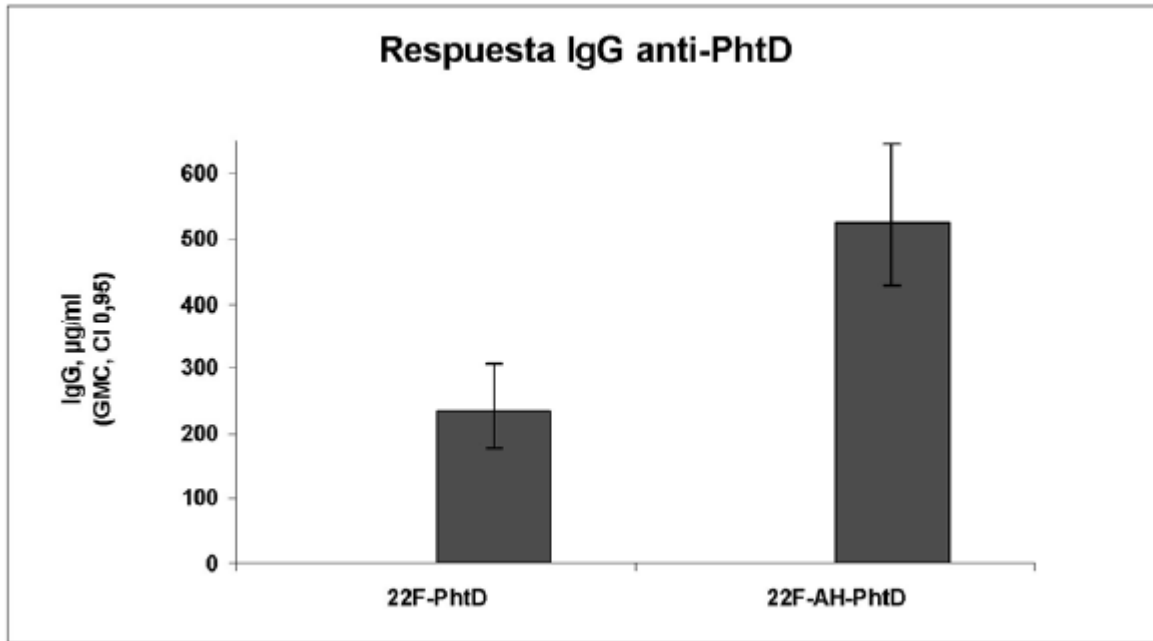


Figura 9. Respuesta de IgG anti-PhtD en suero

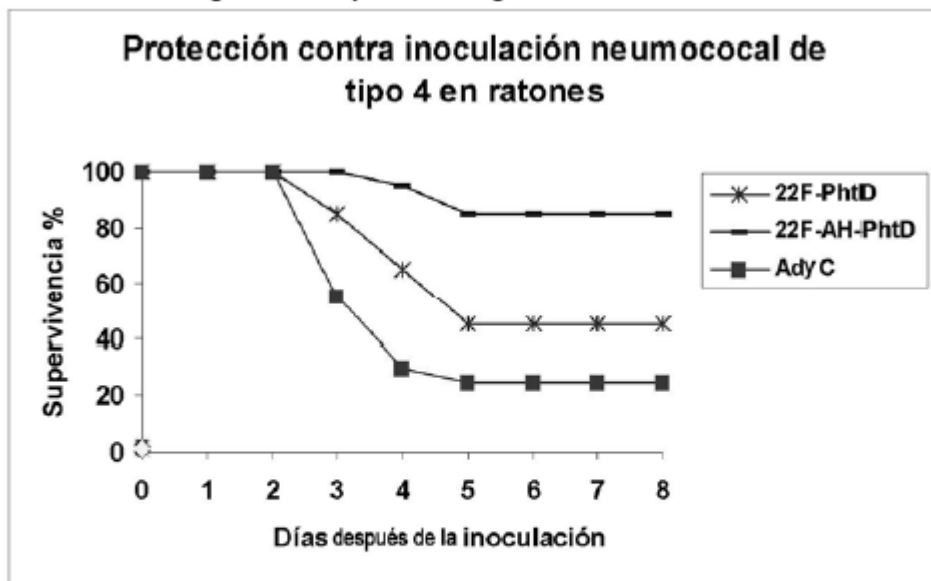


Figura 10

Protección contra inoculación neumococal de tipo 4 en ratones