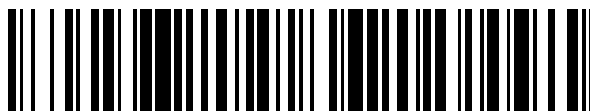


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 662**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/09** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2008 PCT/EP2008/057997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2008 WO09000824**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2008 E 08774248 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2170379**

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

30 Prioridad:

**26.06.2007 GB 0712420**

**26.06.2007 GB 0712428**

**26.06.2007 GB 0712435**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.07.2017**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)**

**RUE DE L'INSTITUT, 89**

**1330 RIXENSART, BE**

72 Inventor/es:

**BIEMANS, RALPH, LEON;**

**HERMAND, PHILIPPE, VINCENT y**

**POOLMAN, JAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 626 662 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Vacuna que comprende conjugados de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*

**Campo de la invención**

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

**5 Antecedentes de la invención**

Los niños menores de 2 años de edad no desarrollan una respuesta inmunitaria contra la mayoría de las vacunas de polisacáridos, de manera que es necesario volver inmunogénicos a los polisacáridos por conjugación química con un vehículo proteico. El acoplamiento del polisacárido, un antígeno independiente de T, a una proteína, un antígeno dependiente de T, confiere al polisacárido las propiedades de dependencia de T incluyendo un cambio de isotipo, maduración de afinidad, e inducción de memoria.

10 Sin embargo puede haber problemas con la administración de conjugados polisacárido-proteína, o la combinación de conjugados polisacárido-proteína para formar vacunas multivalentes. Por ejemplo, se ha informado que la vacuna de polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo B (PRP) que utiliza toxoide tetánico (TT) como vehículo proteico se ensayó en un intervalo de dosis con la inmunización simultánea con TT (libre) y una vacuna de conjugado polisacárido neumocócico-TT siguiendo un protocolo infantil convencional. Según se aumentaba la dosis de vacuna neumocócica, la respuesta inmunitaria contra la parte de polisacárido PRP de la vacuna conjugada de Hib disminuía, indicando una interferencia inmunitaria del polisacárido, posiblemente por el uso del mismo vehículo proteico (Dagan y col., Infect Immun. (1998); 66: 2093-2098).

20 Se probó también que el efecto de la dosificación del vehículo proteico sobre la respuesta humoral contra la propia proteína tenía varias facetas. En los niños humanos se informó que el aumento de la dosificación de un conjugado tetravalente con toxoide tetánico daba como resultado una disminución de la respuesta al vehículo tetánico (Dagan y col. supra). El análisis clásico de estos efectos en la combinación de vacunas se ha descrito como supresión epitópica inducida por el vehículo, la cual no se entiende completamente, pero que se cree que es el resultado de una cantidad excesiva de vehículo proteico (Fattom, Vaccine 17: 126 (1999)). Parece que esto es el resultado de la competencia de los linfocitos Th, por los linfocitos B contra el vehículo proteico y los linfocitos B contra el polisacárido. Si los linfocitos B contra el vehículo proteico predominan, no hay suficientes linfocitos Th disponibles para proporcionar la ayuda necesaria a los linfocitos B específicos contra el polisacárido. Sin embargo, los efectos inmunológicos que se observan no son constantes, con algunos casos en los que la cantidad total de vehículo proteico aumenta la respuesta inmunitaria, y otros casos en los que disminuye la respuesta inmunitaria.

30 Por lo tanto, siguen existiendo dificultades técnicas para combinar múltiples conjugados de polisacárido en una única formulación vacunal eficaz.

El *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria Gram-positiva responsable de una considerable morbilidad y mortalidad (particularmente en jóvenes y ancianos), que produce enfermedades invasivas tales como neumonía, bacteriemia y meningitis, y enfermedades asociadas con la colonización, tales como Otitis media aguda. La tasa de neumonía neumocócica en los EE. UU. en 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 da lugar a bacteriemia, y otras manifestaciones tales como la meningitis, con una tasa de mortalidad cercana al 30 % incluso con tratamiento antibiótico.

40 El neumococo se encapsula con un polisacárido unido químicamente que da lugar a la especificidad del serotipo. Hay 90 serotipos conocidos de neumococos, y la cápsula es el principal determinante de virulencia en los neumococos, ya que la capsula no solo protege la superficie interna de la bacteria del complemento, sino que ella misma es pobremente inmunogénica. Los polisacáridos son antígenos independientes de T, y no se pueden procesar o presentar por moléculas del MHC para que interactúen con los linfocitos T. Sin embargo, pueden estimular el sistema inmunitario mediante un mecanismo alternativo que implica el entrecruzamiento con los receptores de superficie de los linfocitos B.

45 Se ha demostrado en varios experimentos que la protección contra la enfermedad invasiva por neumococos se correlaciona muy fuertemente con los anticuerpos específicos de la cápsula, y la protección es específica del serotipo.

El *Streptococcus pneumoniae* es la causa más común de enfermedad bacteriana invasiva y Otitis media en bebés y niños pequeños. Al igual, los ancianos desarrollan respuestas pobres a las vacunas neumocócicas [Roghmann y col., (1987), J. Gerontol. 42:265-270], de ahí el aumento de incidencia en esta población [Verghese y Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].

55 El documento WO 03/051392 describe una vacuna de *Streptococcus pneumoniae* que comprende 11 o más polisacáridos de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* conjugados con 2 o más vehículos proteicos, en la que los polisacáridos de los serotipos 6B, 19F y 23F se conjugan con un primer vehículo proteico y los restantes serotipos se conjugan con 1 o 2 vehículos proteicos secundarios, y en la que los vehículos proteicos secundarios son

diferentes del primer vehículo proteico. Es por lo tanto un objetivo de la presente invención desarrollar una formulación mejorada de una vacuna de polisacáridos conjugados de *Streptococcus pneumoniae* de múltiples serotipos.

**Breve descripción de las Figuras**

- 5 **Figura 1. Inmunogenicidad del conjugado en monos Rhesus ancianos (niveles de IgG anti-PS post-II).** Gráfico de barras que muestra la inmunogenicidad del conjugado de 11 valencias en monos Rhesus ancianos. Las barras claras representan la GMC tras dos inoculaciones con el conjugado de 11 valencias con adyuvante de fosfato de aluminio. Las barras más oscuras representan la GMC tras dos inoculaciones con el conjugado de 11 valencias con adyuvante C.
- 10 **Figura 2. Inmunogenicidad del conjugado en monos Rhesus ancianos (frecuencias de linfocitos B de memoria anti-PS3 post-II).** Gráfico de barras que muestra los linfocitos B de memoria para el PS3 tras la inoculación con el conjugado de 11 valencias con adyuvante C o adyuvante de fosfato de aluminio.
- 15 **Figura 3. Inmunogenicidad de PS19F en ratones Balb/c (niveles de IgG post-III).** Gráfico de barras que muestra la inmunogenicidad anti-polisacárido 19F en ratones Balb/c para los conjugados de polisacáridos solos de 4 valencias y los PhtD de 4 valencias.
- Figura 4. Inmunogenicidad de PS22F en ratones Balb/c (niveles de IgG post-III).** Gráfico de barras que muestra la inmunogenicidad anti-polisacárido 22F en ratones Balb/c para los polisacáridos solos de 4 valencias y conjugados con PhtD de 4 valencias.
- 20 **Figura 5. Niveles de anticuerpos IgG anti-PS en suero.** Gráfico de barras que muestra la respuesta de IgG anti-22F en ratones Balb/c.
- Figura 6. Títulos de opsono-fagocitosis anti-22F en ratones Balb/c.** Gráfico de barras que muestra los títulos de opsono-fagocitosis anti-22F en ratones Balb/c.
- 25 **Figura 7. Comparación de las respuestas de IgG inducidas post-III inmunizaciones en ratones C57Bl jóvenes con nuevos adyuvantes o AIPO4.** Gráfico de barras que compara las respuestas de IgG inducidas en ratones C57Bl jóvenes tras la inmunización con una vacuna conjugada de 13 valencias formulada con diferentes adyuvantes. Las barras están en el mismo orden que se indica en la columna a mano derecha.
- 30 **Figura 8. Eficacia protectora de la combinación proteica de PhtD y dPIy contra la colonización pulmonar del tipo 19F en monos Rhesus.** Gráfico de barras que muestra la eficacia protectora de combinaciones vacunales diferentes en un modelo de neumonía en el mono. La categoría “muerto” incluye los monos que habrían muerto si no fuera por el tratamiento antibiótico.
- Figura 9. Respuesta de IgG anti-PhtD en el suero.** Gráfico de barras que muestra la respuesta de IgG anti-PhtD en ratones Balb/c tras la inmunización con conjugados 22F-PhtD o 22F-AH-PhtD.
- Figura 10. Protección contra el desafío con neumococos tipo 4 en ratones.** Protección contra el desafío con neumococos tipo 4 en ratones tras la inmunización con 22F-PhtD o 22F-AH-PhtD.
- 35 **Figura 11.** Protección contra el desafío letal con la cepa 3/43 de *S. pneumoniae* tras la inmunización con PhtD y la inmunización pasiva con anticuerpos contra el polisacárido del serotipo 3.
- Figura 12.** Protección contra el desafío letal con la cepa 1/57 de *S. pneumoniae* tras la inmunización con PhtD y la inmunización pasiva con anticuerpos contra el polisacárido del serotipo 1.
- 40 **Figura 13.** Títulos opsonofagocíticos contra el serotipo 19A en ratones C57 negros ancianos inmunizados con conjugados vacunales multivalentes.
- Figura 14.** Títulos opsonofagocíticos contra el serotipo 22F en ratones C57 negros ancianos inmunizados con conjugados vacunales multivalentes.
- 45 **Figura 15.** Títulos opsonofagocíticos contra el serotipo 19A en ratones Balb/c inmunizados con conjugados vacunales multivalentes. Barra 2 - 11V + 19A-dPIy gmbs + 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl; barra 4 - 11V + 19A-dPIy gmbs + 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl; barra 6 2 - 11V + 19A-DT + 22F-PD 0,1 µg/50 µl.
- Figura 16.** Títulos opsonofagocíticos contra el serotipo 22F en ratones Balb/c inmunizados con conjugados vacunales multivalentes.
- Figura 17.** Títulos opsonofagocíticos contra el serotipo 19A en cobayas inmunizadas con conjugados vacunales multivalentes.

50

**Figura 18.** Títulos opsonofagocíticos contra el serotipo 22F en cobayas inmunizadas con conjugados vacunales multivalentes.

**Figura 19.** Títulos opsonofagocíticos contra el serotipo 19A en ratones Balb/c inmunizados con conjugados vacunales multivalentes.

5 **Figura 20.** Títulos opsonofagocíticos contra el serotipo 22F en ratones Balb/c inmunizados con conjugados vacunales multivalentes.

**Figura 21.** Títulos opsonofagocíticos contra el serotipo 19A en ratones OF1 inmunizados con conjugados vacunales multivalentes.

10 **Figura 22.** Títulos opsonofagocíticos contra el serotipo 22F en ratones OF1 inmunizados con conjugados vacunales multivalentes.

### Descripción de la invención

La presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende al menos 7 conjugados de sacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* que incluyen conjugados de sacáridos capsulares de los serotipos 19A y 19F en los que el 19A se conjuga con un vehículo proteico que es un primer toxoide bacteriano y 19F se conjuga con un vehículo proteico que es un segundo toxoide bacteriano y 2-9 de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* se conjugan con la proteína D, en la que la mitad o una minoría de los sacáridos capsulares se conjugan con la proteína D.

El término sacárido capsular incluye polisacáridos capsulares y oligosacáridos que se pueden derivar de los polisacáridos capsulares. Un oligosacárido contiene al menos 4 restos de azúcar. Los términos conjugar y conjugado se refiere a un sacárido capsular unido covalentemente a un vehículo proteico.

Para los fines de esta invención, "inmunizar un huésped humano contra las exacerbaciones de la EPOC" o "tratamiento o prevención de las exacerbaciones de la EPOC" o "reducción de la gravedad de las exacerbaciones de la EPOC" se refieren a una reducción en la incidencia o tasa de exacerbaciones de la EPOC (por ejemplo una reducción en la tasas de un 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 % o más), por ejemplo, en un grupo de pacientes inmunizados con las composiciones o vacunas de la invención.

La expresión toxoide bacteriano incluye toxinas bacterianas que se han inactivado por mutación genética, por tratamiento químico o por conjugación. Los toxoides bacterianos adecuados incluyen el toxoide tetánico, toxoide diftérico, citolisinas o neumolisinas bacterianas. Se han descrito mutaciones de neumolisina (Ply) con menor toxicidad que la neumolisina (documentos WO 90/06951, WO 99/03884). De manera similar, se conocen mutaciones genéticas de toxina diftérica con disminución de su toxicidad (véase posteriormente). Los análogos de toxina diftérica detoxicados genéticamente incluyen CRM197 y otros mutantes descritos en los documentos US 4.709.017, US 5.843.711, US 5.601.827, y US 5.917.017. La CRM197 es una forma de toxina diftérica no tóxica que no se distingue inmunológicamente de la toxina diftérica. La CRM197 se produce por *C. diphtheriae* infectado por la fase  $\beta$ 197tox no toxigénica creada por mutagénesis de nitrosoguanidina del carinofago b (Uchida y col., Nature New Biology (1971) 233; 8-11). La proteína CRM197 tiene el mismo peso molecular que la toxina diftérica pero se diferencia de la misma por un único cambio de base en el gen estructural. Esto da lugar a un cambio de glicina por glutamina en la posición de aminoácido 52 que hace que el fragmento A sea incapaz de unirse a NAD y por lo tanto no tóxico (Pappenheimer 1977, Ann Rev, Biochem. 46; 69-94, Rappuoli Applied and Environmental Microbiology Sept 1983 p. 560-564).

40 El primer y segundo toxoides bacterianos pueden ser el mismo o diferentes. Donde un primer y segundo toxoides diferentes, significa que tienen una secuencia de aminoácidos diferente.

Por ejemplo, 19A y 19F se pueden conjugar con toxoide tetánico y toxoide tetánico; toxoide diftérico y toxoide diftérico; CRM197 y CRM197; neumolisina y neumolisina; toxoide tetánico y toxoide diftérico; toxoide tetánico y CRM197; toxoide tetánico y neumolisina; toxoide diftérico y toxoide tetánico; toxoide diftérico y CRM197; toxoide diftérico y neumolisina; CRM197 y toxoide tetánico; CRM197 y toxoide diftérico; CRM197 y neumolisina; neumolisina y toxoide tetánico; neumolisina y toxoide diftérico; o neumolisina y CRM197, respectivamente.

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

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

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

- 5 En una realización, la mitad o menos de la mitad o una minoría de los conjugados de sacáridos capsulares presentes en la composición inmunogénica de la invención contiene proteína D como vehículo proteico. Por ejemplo en una vacuna de *S. pneumoniae* de 10 valencias, 2, 3, 4, o 5 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con proteína D. Por ejemplo en una vacuna de *S. pneumoniae* de 11 valencias, 2, 3, 4, o 5 de los sacáridos capsulares se conjugan con proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* de 12 valencias, 2, 3, 4, 5, o 6 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con proteína D. Por ejemplo en una vacuna de *S. pneumoniae* de 13 valencias, 2, 3, 4, 5 o 6 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con proteína D. Por ejemplo en una vacuna de *S. pneumoniae* de 14 valencias 2, 3, 4, 5, 6, o 7 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* de 15 valencias 2, 3, 4, 5, 6, o 7 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* de 16 valencias 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* de 17 valencias 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* de 18 valencias 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con proteína D. Por ejemplo, en una vacuna de *S. pneumoniae* de 19 valencias 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los sacáridos capsulares de diferentes serotipos se conjugan con proteína D. Opcionalmente, los serotipos conjugados con proteína D se seleccionan de entre los grupos descritos anteriormente.

En una realización, además de los conjugados de sacáridos de *S. pneumoniae* de 19A y 19F, la composición inmunogénica comprende además conjugados de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C y 23F.

- 25 En una realización, además de los conjugados de sacáridos de *S. pneumoniae* de 19A y 19F, la composición inmunogénica comprende además conjugados de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C y 23F.

- 30 En una realización, además de los conjugados de sacáridos de *S. pneumoniae* de 19A y 19F, la composición inmunogénica comprende además conjugados de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F y 23F.

En una realización, además de los conjugados de sacáridos de *S. pneumoniae* de 19A y 19F, la composición inmunogénica comprende además conjugados de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F y 23F.

- 35 En una realización, además de los conjugados de sacáridos de *S. pneumoniae* de 19A y 19F, la composición inmunogénica comprende además conjugados de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F y 23F.

- 40 Normalmente la vacuna de *Streptococcus pneumoniae* de la presente invención comprenderá sacáridos capsulares antigénicos (opcionalmente conjugados), en los que los sacáridos se derivan de al menos diez serotipos de *S. pneumoniae*. El número de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* puede variar desde 10 serotipos diferentes (o "v", valencias) hasta 23 serotipos diferentes (23v). En una realización, hay 10, 11, 12, 13, 14 o 15 serotipos diferentes. En otra realización de la invención, la vacuna puede comprender sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados y sacáridos de *S. pneumoniae* no conjugados. Opcionalmente, el número de sacáridos de serotipos es menor o igual a 23. Por ejemplo, la invención puede comprender 10 serotipos conjugados y 13 sacáridos no conjugados. De manera similar, la vacuna puede comprender 11, 12, 13, 14, o 16 sacáridos conjugados y 12, 11, 10, 9 o 7 sacáridos no conjugados, respectivamente.

- 45 En una realización la vacuna neumocócica multivalente de la invención se seleccionará de entre los siguientes serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F, aunque se aprecia que uno o más serotipos distintos se podrían sustituir dependiendo de la edad del receptor que recibe la vacuna y la localización geográfica en la que se administrará la vacuna. Por ejemplo una vacuna de 10 valencias puede comprender los polisacáridos de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Una vacuna de 11 valencias puede incluir también sacáridos del serotipo 3 o 19A. Una vacuna pediátrica (para bebés) de 12 o 13 valencias puede incluir también la formulación de 11 valencias (que contiene el sacárido del serotipo 3) suplementada con los serotipos 6A y 19A, o 6A y 22F, o 19A y 22F, o 6A y 15, o 19A y 15, o 22F y 15, mientras que una vacuna para ancianos de 13 valencias puede incluir la formulación de 10 u 11 valencias suplementada con los serotipos 19A y 22F, 8 y 12F, o 8 y 15, o 8 y 19A, o 8 y 22F, o 12F y 15, o 12F y 19A, o 12F y 22F, o 15 y 19A, o 15 y 22F. Una vacuna pediátrica de 14 valencia 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, 15, 19A y 22F; serotipos 3, 8, 19A y 22F; serotipos 3, 12F, 19A y 22F; serotipos 3, 15, 19A y 22F; serotipos 3, 6A, 8 y 22F; serotipos 3, 6A, 12F y 22F; o serotipos 3, 6A, 15 y 22F.

La composición en una realización incluye sacáridos capsulares que se derivan de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (opcionalmente conjugados). En una realización adicional de la invención, se incluyen al menos 11 sacáridos antigénicos (opcionalmente conjugados), por ejemplo los sacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 4, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización adicional de la invención se incluyen al menos 12 o 13 sacáridos antigénicos, 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 los sacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F, aunque también se contemplan en la invención más sacáridos antigénicos, por ejemplo de 23 valencias (tal como de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F).

La composición inmunogénica de la presente invención comprende proteína D (PD) de *Haemophilus influenzae* (véase por ejemplo, el documento EP 0594610 Fig. 9). El *Haemophilus influenzae* es un organismo clave que causa la Otitis media, y los presentes inventores han demostrado que incluyendo esta proteína en una vacuna de *Streptococcus pneumoniae* se proporcionará un nivel de protección contra la Otitis media relacionada con *Haemophilus influenzae* (Pyrmula y col., Lancet 367; 740-748 (2006)). En un aspecto, la PD está presente como vehículo proteico de uno o más de los sacáridos. En otro aspecto, la proteína D podría estar presente en la composición vacunal como una proteína libre. En un aspecto adicional, la proteína D está presente tanto como vehículo proteico como en proteína libre. La proteína D se puede utilizar como proteína de longitud completa o como un fragmento (documento WO0056360). En un aspecto adicional, la proteína D está presente como vehículo proteico para la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8, 9 o más de los sacáridos pueden estar conjugados con proteína D. En este aspecto, la proteína D puede estar presente también como proteína libre.

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

Cualquiera de los sacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* presentes en la composición inmunogénica de la invención, excepto 19A y 19F se pueden conjugar con un vehículo proteico que se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C o TT, PhtD, fusiones PhtBE o PhtDE (particularmente las descritas en los documentos WO 01/98334 y WO 03/54007), neumolisina detoxificada y proteína D. Una lista más completa de los vehículos proteicos que se pueden utilizar en los conjugados de la invención se presenta posteriormente.

El vehículo proteico conjugado con uno o más de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* en los conjugados presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención opcionalmente es un miembro de las proteínas de la familia de la tríada de polihistidina (Pht), fragmentos o proteínas de fusión de las mismas. Las proteínas PhtA, PhtB, PhtD o PhtE pueden tener una secuencia de aminoácidos que comparten un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con una secuencia desvelada en los documentos WO 00/37105 o WO 00/39299 (por ejemplo con la secuencia de los aminoácidos 1-838 o 21-838 de SEQ ID NO: 4 del documento WO 00/37105 para la PhtD). Por ejemplo, las proteínas de fusión se componen de 2, 3, o 4 fragmentos de PhtA, PhtB, PhtD, PhtE o de longitud completa. Ejemplos de proteínas de fusión son PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E, PhtD/A, PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B y PhtE/D, en las que las proteínas se unen con la primera mencionada en el extremo N (véase por ejemplo, el documento WO01/98334).

Cuando se utilizan fragmentos de proteínas Pht (por separado o como parte de una proteína de fusión), cada fragmento contiene opcionalmente uno o más motivos de tríadas de histidina y/o regiones de superenrollamiento de dichos polipéptidos. Un motivo de tríada de histidina es la parte de polipéptido que tiene la secuencia HxxHxH en la que H es histidina y x es un aminoácido distinto de histidina. Una región de superenrollamiento es una región predicha por el algoritmo "Coils" Lupus, A y col. (1991) Science 252; 1162-1164. En una realización el fragmento o cada fragmento incluyen uno o más motivos de tríada de histidina así como al menos una región de superenrollamiento. En una realización el fragmento o cada fragmento contiene exactamente o al menos 2, 3, 4, o 5 motivos de tríada de histidina (opcionalmente, con una secuencia de Pht nativa entre las 2 o más tríadas, o intra-secuencia de tríada que es más del 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % idéntica a una secuencia de Pht intra-tríada neumocócica- por ejemplo, la secuencia intra-tríada que se muestra en SEQ ID NO: 4 del documento WO 00/37105 para la PhtD). En una realización, el fragmento o cada fragmento contiene exactamente o al menos 2, 3 o 4 regiones de superenrollamiento. En una realización una proteína Pht desvelada en el presente documento incluye la proteína de longitud completa con la secuencia de señal acoplada, la proteína madura de longitud completa en la que se ha eliminado el péptido de señal (por ejemplo, de 20 aminoácidos en el extremo N), variantes de origen natural de la proteína Pht y fragmentos inmunogénicos de la proteína Pht (por ejemplo, los fragmentos que se describen anteriormente o los polipéptidos que comprenden al menos 15 o 20 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos del documento WO00/37105 (SEQ ID NO: 4, 6, 8 o 10) o el documento WO00/39299 (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 o 14) en el que dicho polipéptido es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria contra dicha secuencia de aminoácidos del documento WO00/37105 o el documento WO00/39299.

- En particular, el término "PhtD" como se utiliza en el presente documento incluye la proteína de longitud completa con la secuencia de señal acoplada, la proteína madura de longitud completa en la que se ha eliminado el péptido de señal (por ejemplo, 20 aminoácidos del extremo N), variantes de PhtD de origen natural y fragmentos inmunogénicos de PhtD (por ejemplo los fragmentos que se han descrito anteriormente o los polipéptidos que comprenden al menos 15 o 20 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos de PhtD de los documentos WO00/37105 o WO00/39299. en el que dicho polipéptido es capaz de desarrollar una respuesta inmunitaria específica contra dicha secuencia de aminoácidos de PhtD de los documentos WO00/37105 o WO00/39299 (por ejemplo, SEQ ID NO: 4 del documento WO 00/37105 o SEQ ID NO: 14 del documento WO 00/39299 para PhtD). Todas las formas de PhtD mencionadas anteriormente se pueden utilizar en la presente invención.
- Si el vehículo proteico es el mismo para 2 o más sacáridos de la composición, los sacáridos se podrían conjugar con la misma molécula del vehículo proteico (moléculas de vehículo que tienen 2 o más sacáridos diferentes conjugados con ella) [véase, por ejemplo, el documento WO 04/083251]. De manera alternativa, los sacáridos pueden conjugarse por separado cada uno con diferentes moléculas del vehículo proteico (cada molécula del vehículo proteico solo tiene un tipo de sacárido conjugado con ella).
- Ejemplos de vehículos proteicos que se pueden utilizar en la presente invención son DT (toxoides diftérico), TT (toxoides tetánico) o fragmento C de TT, DT, CRM197 (un mutante de DT) otros mutantes puntuales de DT, tales como CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida y col. J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en *Genetically Engineered Toxins*, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; una eliminación o mutación de Glu-148 por Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 por Gly y otras mutaciones desveladas en los documentos US 4709017 o US 4950740; la mutación de al menos uno o más restos de Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones desveladas en los documentos US 5917017 o US 6455673; o los fragmentos desvelados en el documento US 5843711, neumolisina neumocócica (Kuo y col. (1995) *Infect Immun* 63; 2706-13) que incluye la ply, detoxificada de alguna manera, por ejemplo, dPLY-GMBS (documentos WO 04081515, PCT/EP2005/010258) o dPLY-formol, las PhtX, que incluyen PhtA, PhtB, PhtD, PhtE y proteínas de fusión de proteínas Pht por ejemplo fusiones PhtDE, fusiones PhtBE (documentos WO 01/98334 y WO 03/54007), (Pht A-E se describen con más detalle posteriormente), OMPC (proteína meningocócica de membrana externa – habitualmente 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 la misma, péptidos sintéticos (documentos EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (documentos 93/17712, WO 94/03208), proteínas de *pertussis* (documentos WO 98/58668, EP0471177), citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de linfocitos T CD4+ humanos de varios antígenos derivados de agentes patógenos (Falugi y col. (2001) *Eur J Immunol* 31; 3816-3824) tales como la proteína N19 (Baraldoi y col. (2004) *Infect Immun* 72; 4884-7), proteína neumocócica de superficie PspA (documento WO 02/091998), proteínas captadoras de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761).
- Nurkka y col., *Pediatric Infectious Disease Journal*. 23(11):1008-14, 2004 Nov. describían una vacuna neumocócica de 11 valencias con todos los serotipos conjugados con PD. Sin embargo, los presentes inventores han demostrado que la actividad opsonofagocítica mejoraba en los anticuerpos inducidos con conjugados que tenían 19F conjugado con DT en comparación con 19F conjugado con PD. Además, los presentes inventores han demostrado que se ve una mayor reactividad cruzada contra 19A si el 19F está conjugado con DT. Por lo tanto es una característica de la presente invención que el serotipo 19F se conjuga con un toxoide bacteriano, por ejemplo, TT, neumolisina, DT o CRM197. En un aspecto, el serotipo 19F se conjuga con DT. También es una característica de la invención que el serotipo 19A se conjuga con un toxoide bacteriano, por ejemplo, TT, neumolisina, DT o CRM197. Los restantes sacáridos serotípicos de la composición inmunogénica pueden estar todos conjugados a uno o más vehículos proteicos que no sean DT (es decir, solamente el 19F se conjuga con DT), o pueden estar divididos entre uno o más vehículos proteicos que no sean DT y el propio DT. En una realización, el 19F se conjuga con DT o CRM197, y el resto de serotipos se dividen entre PD, y TT o DT o CRM197. En una realización adicional, el 19F se conjuga con DT o CRM 197 y no más de un sacárido se conjuga con TT. En un aspecto de la presente realización, dicho un sacárido es 18C o 12F. En una realización adicional, el 19F se conjuga con DT o CRM197 y no más de dos sacáridos se conjugan con TT. En una realización adicional, el 19F se conjuga con DT o CRM197 y el resto de serotipos se dividen entre PD, TT, y DT o CRM197. En una realización adicional, el 19F se conjuga con DT o CRM197 y los restantes serotipos se dividen entre PD, TT, neumolisina. En una realización adicional, el 19F se conjuga con DT o CRM197, y el resto de los serotipos se dividen entre PD, TT y CRM197. En una realización adicional, el 19F se conjuga con DT o CRM197 y el resto de los serotipos se dividen entre PD, TT, neumolisina y opcionalmente PhtD o la proteína de fusión PhtD/E. En una realización adicional, el 19F se conjuga con DT o CRM197, 19A se conjuga con neumolisina o TT y el resto de los serotipos se divide entre PD, TT, neumolisina y opcionalmente PhtD o la proteína de fusión PhtD/E. En una realización adicional, el 19F se conjuga con DT o CRM197, el 19A se conjuga con neumolisina o TT, un sacárido adicional se conjuga con TT, un sacárido adicional se conjuga con PhtD o PhtD/E y todos los sacáridos adicionales se conjugan con PD. En una realización adicional el 19F se conjuga con DT o CRM197, 19A se conjuga con neumolisina, un sacárido adicional se conjuga con TT, un sacárido adicional se conjuga con neumolisina, 2 sacáridos adicionales se conjugan con PhtD o PhtD/E y todos los sacáridos adicionales se conjugan con PD.

El término “sacárido” a lo largo de la presente memoria descriptiva puede indicar un polisacárido u oligosacárido e incluye ambos. Los polisacáridos se aíslan a partir de bacterias y se pueden modificar de tamaño en algún grado por procedimientos conocidos (véase por ejemplo los documentos EP497524 y EP497525) y opcionalmente por microfluidificación. Los polisacáridos se pueden modificar de tamaño con el fin de reducir la viscosidad en las muestras de polisacáridos y/o para mejorar la filtración de los productos conjugados. Los oligosacáridos tienen un número bajo de unidades de repetición (normalmente de 5-30 unidades de repetición) y normalmente son polisacáridos hidrolizados.

Los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* comprenden unidades de oligosacárido repetidas que pueden contener hasta 8 restos de azúcar. Para una revisión de las unidades de oligosacáridos de los serotipos clave de *Streptococcus pneumoniae* véase JONES, Christopher. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. An. Acad. Bras. Ciênc., Junio 2005, vol. 77, n° 2, p. 293-324. Tabla II ISSN 0001-3765. En una realización un sacárido capsular antigénico puede ser un polisacárido de longitud completa, sin embargo en otras puede ser una unidad de oligosacárido, o uno más corto que la cadena de sacárido de longitud nativa de unidades de oligosacárido repetidas. En una realización, todos los sacáridos presentes en la vacuna son polisacáridos. Los polisacáridos de longitud completa se pueden “modificar de tamaño” es decir que su tamaño se puede reducir por distintos procedimientos tales como un tratamiento de hidrólisis ácida, tratamiento con peróxido de hidrógeno, modificación de tamaño por emulsiflex® seguida por un tratamiento con peróxido de hidrógeno para generar fragmentos de oligosacárido o por microfluidificación.

Los inventores también han señalado que el foco de la técnica ha estado en el uso de oligosacáridos para facilitar la producción de conjugados. Los inventores han descubierto que con la utilización de conjugados de polisacáridos nativos o ligeramente modificados de tamaño, se pueden apreciar una o más de las siguientes ventajas: 1) un conjugado que tiene alta inmunogenicidad que se puede filtrar, 2) la relación de polisacárido respecto a la proteína del conjugado se puede alterar de manera que la relación de polisacárido respecto a la proteína (p/p) en el conjugado se puede aumentar (lo que puede tener un efecto sobre el efecto de supresión del vehículo), e) los conjugados inmunogénicos que tienden a hidrolizarse pueden estabilizarse con el uso de sacáridos más grandes en la conjugación. El uso de polisacáridos mayores puede dar como resultado más entrecruzamiento con el vehículo conjugado y puede disminuir la liberación de sacárido libre del conjugado. Las vacunas de conjugados descritas en la técnica anterior tienden a despolimerizar los polisacáridos antes de la conjugación con el fin de mejorar la conjugación. Los presentes inventores han descubierto que las vacunas de sacáridos conjugados que mantienen un tamaño mayor del sacárido pueden proporcionar una buena respuesta inmunitaria contra la enfermedad neumocócica.

La composición inmunogénica de la invención puede comprender por lo tanto uno o más conjugados de sacáridos en los que el tamaño medio (peso medio del peso molecular, Pm) de cada sacárido antes de la conjugación está por encima de 80 kDa, 100 kDa, 200 kDa, 300 kDa, 400 kDa, 500 kDa o 1000 kDa. En una realización, el conjugado tras la conjugación se debería poder filtrar fácilmente a través de un filtro de 0,2 micras de manera que se pueda obtener más del 50, 60, 70, 80, 90 o 95 % tras la filtración en comparación con la muestra antes de la filtración.

Para los fines de la invención, “polisacárido nativo” se refiere a un sacárido que no se ha sometido a un procedimiento, cuyo fin sea reducir el tamaño del sacárido. Un polisacárido se puede reducir ligeramente de tamaño durante los procedimientos de purificación normales. Dicho sacárido sigue siendo nativo. Solamente si el polisacárido se ha sometido a técnicas de modificación de tamaño, el polisacárido no se consideraría nativo. El tamaño de un polisacárido nativo es por ejemplo entre 250 kDa - 2.000 kDa, 400 - 1.500 kDa, 750 kDa - 1.250 kDa, 300 kDa - 600 kDa, 500-1.000 kDa, o 1.000-1.500 kDa con diferentes serotipos que tienen diferentes tamaños del polisacárido nativo como será evidente para el experto en la técnica.

Para los fines de la invención, “modificado de tamaño por un factor de hasta x2” significa que el sacárido se somete a un procedimiento que tiene la intención de reducir el tamaño del sacárido pero que mantiene un tamaño de más de la mitad del tamaño del polisacárido nativo. X3, x4, etc. se tienen que interpretar de la misma manera, es decir, el sacárido se somete a un procedimiento que tiene la intención de reducir el tamaño del polisacárido pero mantiene un tamaño de más de un tercio, un cuarto, etc. del tamaño de un polisacárido nativo. En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de entre al menos 10 serotipos conjugados con un vehículo proteico, en el que al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o cada sacárido de *S. pneumoniae* es un polisacárido nativo.

En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de entre al menos 10 serotipos conjugados con un vehículo proteico, en el que al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o cada sacárido de *S. pneumoniae* está modificado de tamaño 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 modificados de tamaño por un factor de hasta x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 o x10.

El peso molecular o peso molecular medio de un sacárido del presente documento se refiere al peso molecular (Pm) de peso medio del sacárido medido antes de la conjugación y se mide por MALLS.



La técnica MALLS se conoce bien en la técnica y se lleva a cabo normalmente como se describe en el ejemplo 2. Para el análisis MALLS de sacáridos neumocócicos, se pueden utilizar dos columnas (TSKG6000 y 5000PWxl) en combinación y los sacáridos se eluyen en agua. Los sacáridos se detectan utilizando un detector de dispersión lumínica (por ejemplo el Wyatt Dawn DSP equipado con un láser de argón a 488 nm) y el refractómetro interferométrico (por ejemplo Wyatt Otilab DSP equipado con una celda P100 y un filtro rojo a 498 nm).

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

En una realización, los sacáridos de *S. pneumoniae* se modifican de tamaño por escisión mecánica, por ejemplo por microfluidificación o sonicación. La microfluidificación y sonicación tienen la ventaja de disminuir el tamaño de los polisacáridos nativos más grandes suficientemente para proporcionar un conjugado que se puede filtrar. La modificación de tamaño es 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 hechos de una mezcla de polisacáridos nativos y sacáridos que se han modificado de tamaño por un factor no mayor de x20. En un aspecto de la presente realización, la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8 o más de los sacáridos se han modificado de tamaño por un factor de hasta x2, x3, x4, x5 o x6.

En una realización, el sacárido de *Streptococcus pneumoniae* se conjuga con un vehículo proteico por medio de un engarce, por ejemplo un engarce bifuncional. El engarce opcionalmente es heterobifuncional u homobifuncional, que tiene por ejemplo, un grupo amino reactivo y un grupo ácido carboxílico reactivo, 2 grupos reactivos amino o dos grupos reactivos de ácido carboxílico. El engarce tiene por ejemplo entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un engarce posible es ADH. Otros engarces incluyen B-propionamida (documento WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gevert y col. (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), haloalquil hálidos (documento US4057685), uniones glucosídicas (documentos US4673574, US4808700), hexano diamina y ácido 6-aminocaproico (documento US4459286). En una realización, se utiliza ADH como engarce para conjugar el sacárido del serotipo 18C.

Los conjugados de sacáridos presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden preparar por cualquier técnica de acoplamiento conocida. El procedimiento de conjugación puede basarse en la activación del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetil amino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El sacárido activado se puede por lo tanto acoplar directamente o por medio de un grupo espaciador (engarce) con un grupo amino en el vehículo proteico. Por ejemplo, el espaciador podría ser una cistamina o cisteamina para dar un polisacárido tiolado que se podría acoplar al vehículo por vía de una unión tioéter obtenida después de la reacción con un vehículo proteico activado por maleimida (por ejemplo utilizando GMBS) o un vehículo proteico haloacetilado (por ejemplo utilizando yodoacetimida [por ejemplo, HCl de etil yodoacetimida] o bromoacetato de N-succinimidilo o SIAB, o SIA, o SBAP). Opcionalmente, el éster de cianato (opcionalmente producido por química CDAP) se acopla con hexano diamina o ADH y el sacárido amino derivado se conjuga con el vehículo proteico utilizando química carbodiimida (por ejemplo EDAC o EDC) por medio de un grupo carboxilo en el vehículo proteico. Dichos conjugados se describen en la solicitud PCT publicada WO 93/15760 Uniformed Services University y documentos WO 95/08348 y WO 96/29094.

Otras técnicas adecuadas utilizan carbodiimidias, carbiinidas, hidracidas, 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 engarce carbonilo que se puede formar por reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (Bethell y col. J. Biol. Chem. 1979, 254; 2572-4, Hearn y col. J. Chromatogr. 1981. 218; 509-18) seguido por la reacción con una proteína para formar un engarce carbamato. Esto puede implicar la reducción del extremo anomérico en un grupo hidroxilo primario, la reacción de protección/desprotección opcional del primer grupo hidroxilo del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un carbamato CDI intermedio y el acoplamiento del carbamato CDI intermedio con un grupo amino de la proteína.

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

Un procedimiento adicional implica el acoplamiento de un sacárido activado por bromuro cianógeno (o CDAP) derivado con dihidracida del ácido adípico (ADH) con un vehículo proteico por condensación de carbodiimida (Chu C. y col., Infect. Immunity, 1983 245 256), por ejemplo utilizando EDAC.

En una realización, un grupo hidroxilo (opcionalmente un grupo hidroxilo activado, por ejemplo un grupo hidroxilo activado para producir un grupo éster de cianato [por ejemplo, utilizando CDAP] en un sacárido se une con un grupo amino o carboxílico en una proteína sea directa o indirectamente (mediante un engarce). Cuando está presente un engarce, un grupo hidroxilo del sacárido se une opcionalmente a un grupo amino del engarce, por ejemplo utilizando conjugación CDAP. Un grupo amino adicional del engarce (por ejemplo, ADH) se puede conjugar con un grupo de ácido carboxílico de una proteína, por ejemplo utilizando química carbodiimida, por ejemplo utilizando EDAC. En una realización, el sacárido capsular neumocócico se conjuga con el engarce primero antes de que el engarce se conjugue con el vehículo proteico. De manera alternativa, el engarce puede conjugarse al vehículo antes de la

conjugación con el sacárido.

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

5 En general, se pueden utilizar los siguientes tipos de grupos químicos de un vehículo proteico para el acoplamiento/conjugación:

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

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

15 C) Sulfhidrilo (por ejemplo, mediante una cisteína). En una realización este grupo se une a un sacárido o un engarce bromo o cloro acetilados con química maleimida. En una realización este grupo se activa/modifica con bis diazobencidina.

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

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

F) Grupo guanidilo (por ejemplo, mediante arginina).

G) Grupo indolilo (por ejemplo, mediante triptófano).

25 En un sacárido, en general se pueden utilizar los siguientes grupos para el acoplamiento: OH, COOH, o NH<sub>2</sub>. Se pueden generar grupos aldehído tras diferentes tratamientos conocidos en la técnica tal como: peryodato, hidrólisis ácida, peróxido de hidrógeno, etc.

*Estrategias de acoplamiento directo:*

Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH<sub>2</sub>-Prot → conjugado

Sacárido-aldehído + NH<sub>2</sub>-Prot → base Schiff + NaCNBH<sub>3</sub> → conjugado

Sacárido-COOH + NH<sub>2</sub>-Prot + EDAC → conjugado

30 Sacárido-NH<sub>2</sub> + COOH-Prot + EDAC → conjugado

*Estrategias de acoplamiento indirecto mediante un espaciador (engarce):*

Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH<sub>2</sub>---NH<sub>2</sub> → Sacárido---NH<sub>2</sub> + COOH-Prot + EDAC → conjugate

35 Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH<sub>2</sub>—SH → Sacárido—SH + SH-Prot (Proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida tras la modificación de grupos amino de la proteína por SPDP, por ejemplo) → Sacárido-S-S-Prot

Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH<sub>2</sub>—SH → Sacárido---SH + maleimida-Prot (modificación de grupos amino) → conjugado

40 Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH<sub>2</sub>----SH → Sacárido-SH + haloacetilado-Prot → Conjugado

Sacárido-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>---NH<sub>2</sub> → Sacárido --- NH<sub>2</sub> + EDAC + COOH-Prot → conjugado

Sacárido-COOH + EDAC+ NH<sub>2</sub>---SH → Sacárido---SH + SH-Prot (Proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida tras modificación de grupos amino de la proteína por SPDP por ejemplo) → Sacárido-S-S-Prot

45 Sacárido-COOH + EDAC+ NH<sub>2</sub>----SH → Sacárido---SH + maleimida-Prot (modificación de grupos amino) → conjugado

Sacárido-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>----SH ----> Sacárido-SH + haloacetilado-Prot ----> Conjugado

Sacárido-Aldehído + NH<sub>2</sub> -- NH<sub>2</sub> → Sacárido---NH<sub>2</sub> + EDAC + COOH-Prot ----> conjugado

Nota: en vez de EDAC anteriormente, se puede utilizar cualquier carbodiimida adecuada.

5 En resumen, los tipos de grupos químicos del vehículo proteico que se pueden utilizar en general para el acoplamiento con un sacárido son grupos amino (por ejemplo en los restos de lisina), grupos COOH (por ejemplo en restos de ácido aspártico y ácido glutámico) y grupos SH (si son accesibles) (por ejemplo en restos de cisteína).

Opcionalmente, la relación de vehículo proteico respecto a sacárido de *S. pneumoniae* es entre 1:5 y 5:1; 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 vehículo proteico respecto a sacárido que es mayor de 1:1, por ejemplo, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1 o 1,6:1.

10 En una realización, al menos un sacárido de *S. pneumoniae* se conjuga con un vehículo proteico mediante un engarce utilizando CDAP y EDAC. Por ejemplo, 18C se puede conjugar con una proteína mediante un engarce (por ejemplo, los que tienen dos grupos hidracina en sus extremos tales como ADH) utilizando CDAP y EDAC como se ha descrito anteriormente. Cuando se utiliza un engarce, se puede utilizar CDAP para conjugar el sacárido a un engarce y entonces se puede utilizar EDAC para conjugar el engarce a una proteína, o de manera alternativa, se  
15 puede utilizar EDAC primero para conjugar el engarce a la proteína, tras lo cual se puede utilizar CDAP para conjugar el engarce al sacárido.

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

20 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 alrededor o exactamente 1 µg o algunos sacáridos capsulares pueden estar presentes a una dosis de alrededor o exactamente de 3 µg. En una realización, los sacáridos de los serotipos 3, 18C y 19F (o 4, 18C y 19F) están presentes a una dosis mayor que otros sacáridos. En un aspecto de la presente  
25 realización, los serotipos 3, 18C y 19F (o 4, 18C y 19F) están presentes a una dosis de alrededor o exactamente 3 µg mientras que otros sacáridos en la composición inmunogénica están presentes a una dosis de alrededor o exactamente 1 µg.

“Alrededor” o “aproximadamente” se define como un 10 % más o menos de la figura determinada para los fines de la invención.

30 En una realización, al menos uno de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* está conjugado directamente con un vehículo proteico. Opcionalmente, el al menos uno de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* está conjugado directamente por CDAP. En una realización, la mayoría de los sacáridos capsulares, por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9 o más están unidos directamente al vehículo proteico por CDAP (véase los documentos WO 95/08348 y WO 96/29094).

35 La composición inmunogénica puede comprender proteínas de *Streptococcus pneumoniae*, denominadas en el presente documento proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la invención. Dichas proteínas se pueden utilizar como vehículos proteicos, o pueden estar presentes como proteínas libres, o pueden estar presentes tanto como vehículos proteicos y como proteínas libres. Las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la invención se exponen en la superficie, al menos durante parte del ciclo de vida del neumococo, o son proteínas que se secretan o liberan por los neumococos. Opcionalmente, las proteínas de la invención se seleccionan de entre las siguientes categorías, tal como las proteínas que tienen un motivo de secuencia de señal tipo II o LXXC (donde X es cualquier aminoácido, por ejemplo, la familia de tríadas de polihistidina (PhtX)), proteínas de unión a colina (CbpX), proteínas que tienen un motivo de secuencia de señal Tipo I (por ejemplo, Sp101), proteínas que tienen un motivo LPXTG (donde X es cualquier aminoácido, por ejemplo, Sp128, Sp130), y toxinas (por ejemplo, Ply). Ejemplos de estas categorías (o motivos) son las siguientes proteínas, o equivalentes inmunológicamente funcionales de las mismas.

45 En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende al menos 1 proteína que se selecciona de entre el grupo que consiste en la familia de tríadas de polihistidina (PhtX), familia de proteínas de unión a la colina (CbpX), CbpX truncadas, familia LytX, LytX truncadas, proteínas quiméricas (o fusiones) CbpX truncada - LytX truncada, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133. En una realización adicional, la composición inmunogénica comprende 2 o más proteínas que se seleccionan de entre el grupo que consiste en la familia de tríadas de polihistidina (PhtX), familia de proteínas de unión a la colina (CbpX), CbpX truncadas, familia LytX, LytX truncadas, proteínas quiméricas (o fusiones) CbpX truncada - LytX truncada, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, y Sp128. En una realización más, la composición inmunogénica comprende 2 o más proteínas que se seleccionan de entre el grupo que consiste en la familia de tríadas de polihistidina (PhtX), familia de proteínas de unión a la colina (CbpX), CbpX truncadas, familia LytX, LytX truncadas, proteínas quiméricas (o fusiones) CbpX  
50 truncada - LytX truncada, neumolisina (Ply), y Sp128.

La familia Pht (tríadas de polihistidina) comprende las proteínas PhtA, PhtB, PhtD, y PhtE. La familia se caracteriza por una secuencia de lipidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y varias tríadas de histidina,

posiblemente implicadas en la unión metálica o de nucleósido o actividad enzimática, (3-5) regiones superenrolladas, un extremo N conservado y un extremo C heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos ensayadas. También se han encontrado proteínas homólogas en otros Estreptococos y Neisserias. En una realización de la invención, la proteína Pht de la invención es la PhtD. Se entenderá, sin embargo que los términos Pht A, B, D y E se refieren a proteínas que tienen secuencias desveladas en las citas bibliográficas posteriores así como las variantes de origen natural (y artificiales) de las mismas que tengan una homología de secuencia que sea al menos un 90 % idéntica a las proteínas a las que se hace referencia. Opcionalmente al menos un 95 % idéntica o al menos un 97 % idéntica.

Con respecto a las proteínas PhtX, la PhtA se desvela en el documento WO 98/18930, y también se hace referencia a la misma como Sp36. Como se ha señalado anteriormente, es una proteína de la familia de tríadas de polihistidina y tiene el motivo de señal tipo II o LXXC. La PhtD se desvela en el documento WO 00/37105, y se hace referencia también a la misma como Sp036D. Como se ha señalado anteriormente, también es una proteína de la familia de tríadas de polihistidina y tiene el motivo de señal tipo II LXXC. La PhtB se desvela en el documento WO 00/37105, y también se hace referencia a la misma como Sp036B. Otro miembro de la familia PhtB es el polipéptido de degradación C3, como se desvela en el documento WO 00/17370. Esta proteína también es de la familia de tríadas de polihistidina y tiene el motivo de señal tipo II LXXC. Por ejemplo, el equivalente inmunológicamente funcional es la proteína Sp42 desvelada en el documento WO 98/18930. Una PhtB truncada (aproximadamente de 79 kD) se desvela en el documento WO99/15675 que se considera también como un miembro de la familia PhtX. La PhtE se desvela en el documento WO00/30299 y se hace referencia a la misma como BVH-3. Cuando se hace referencia en el presente documento a cualquier proteína Pht, significa que se pueden utilizar fragmentos inmunogénicos de las proteínas Pht o fusiones de las mismas. Una referencia a PhtD o PhtB también hace referencia a las fusiones PhtDE o PhtBE como se encuentran, por ejemplo, en el documento WO0198334.

La neumolisina es una toxina multifuncional con distintas actividades citolíticas (hemolítica) y de activación del complemento (Rubins y col., Am. Respi. Cit Care Med, 153:1339-1346 (1996)). La toxina no se secreta por neumococos, pero se libera con la lisis de neumococos bajo la influencia de la autolisina. Sus efectos incluyen, por ejemplo, la estimulación de la producción de citocinas inflamatorias por monocitos humanos, la inhibición de la pulsación de los cilios en el epitelio respiratorio humano, y la disminución de la actividad bactericida y migración de neutrófilos. El efecto más obvio de la neumolisina es la lisis de los glóbulos rojos sanguíneos, que implica la unión al colesterol. Debido a que es una toxina, es necesario detoxificarla (es decir, que no sea tóxica para un ser humano cuando se proporciona a una dosis adecuada para la protección) antes de que se pueda administrar *in vivo*. La expresión y clonación de la neumolisina nativa o de tipo silvestre se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Walker y col. (Infect Immun, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell y col. (Biochim Biophys Acta, 1007:67-72 (1989) y Mitchell y col. (NAR, 18:4010 (1990)). La detoxificación de Ply se puede llevar a cabo por medios químicos, por ejemplo, sometiéndola a tratamiento con formalina o glutaraldehído o una combinación de ambos (documentos WO 04081515, PCT/EP2005/010258). Dichos procedimientos se conocen bien en la técnica para distintas toxinas. De manera alternativa, la Ply se puede detoxicar genéticamente. Por lo tanto, la invención engloba derivados de proteína neumocócica que pueden ser, por ejemplo, proteínas mutadas. El término "mutado" se utiliza en el presente documento para significar una molécula que se ha sometido a eliminación, adición o sustitución de uno o más aminoácidos utilizando técnicas bien conocidas de mutagénesis dirigida al sitio o cualquier otro procedimiento convencional. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, una proteína Ply mutante se puede alterar de manera que sea biológicamente inactiva mientras que mantenga aún sus epítomos inmunogénicos, véase, por ejemplo, los documentos WO90/06951, Berry y col. (Infect Immun, 67:981-985 (1999)) y WO99/03884.

Como se utiliza en el presente documento, se entenderá que la abreviatura "Ply" se refiere a una neumolisina mutada o detoxificada adecuada para su uso médico (es decir, no tóxica).

En lo que concierne a la familia de proteínas de unión a la colina (CbpX), los miembros de esa familia se identificaron originalmente como proteínas neumocócicas que se podían purificar por una cromatografía de afinidad a colina. Todas las proteínas de unión a la colina se unen no covalentemente a restos de fosforilcolina del ácido teicoico de la pared celular y el ácido lipoteicoico asociado a la membrana. Estructuralmente, tienen varias regiones en común entre la familia entera, aunque la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia de aminoácidos, longitud, etc.) puede variar. En general las proteínas de unión a la colina comprenden una región terminal N (N), regiones conservadas repetidas (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 la mitad de la proteína. Como se utiliza en esta solicitud, la expresión "familia de unión a la colina (CbpX)" se selecciona de entre el grupo que consiste en las proteínas de unión a la colina como se identifica en el documento WO97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, y CbpG. La PbcA se desvela en el documento WO97/41151. CbpD y CbpG se desvelan en el documento WO00/29434. PspC se desvela en el documento WO97/09994. PbcA se desvela en el documento WO98/21337. SpsA es una proteína de unión a la colina que se desvela en el documento WO 98/39450. Opcionalmente, las proteínas de unión a la colina se seleccionan de entre el grupo que consiste en CbpA, PbcA, SpsA y PspC.

Una realización de la invención comprende CbpX truncadas en las que "CbpX" se ha definido anteriormente y "truncadas" se refiere a las proteínas CbpX que carecen de un 50 % o más de la región de unión a la colina (C). Opcionalmente dichas proteínas carecen completamente de la región de unión a la colina. Opcionalmente, dichas proteínas truncadas carecen (i) de la región de unión a la colina y (ii) también de una porción de la mitad del extremo

N de la proteína, mientras que mantienen al menos una región repetida (R1 o R2). Opcionalmente, la truncada tiene 2 regiones repetidas (R1 y R2). Ejemplos de dichas realizaciones son NR1 x R2 y R1 x R2 como se ilustra en los documentos WO99/51266 o WO99/51188, sin embargo, también se contemplan en el ámbito de la presente invención otras proteínas de unión a la colina que carecen de una región de unión a la colina similar.

5 La familia LytX tiene proteínas asociadas a la membrana que se asocian con la lisis celular. El dominio del extremo N comprende un dominio(s) de unión a colina, sin embargo la familia LytX no tiene todas las características que se encuentran en la familia CbpA que se han señalado anteriormente y por lo tanto, para la presente invención, la familia LytX se considera distinta de la familia CbpX. Al contrario que en la familia CbpX, el dominio del extremo C contiene el dominio catalítico de la familia de proteínas LytX. La familia comprende la Lyt A, B y C. Con respecto a la familia LytX, la LytA se desvela en Ronda y col., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). La LytB se desvela en el documento WO 98/18930, a la que también se hace referencia como Sp46. La LytC también se desvela en el documento WO 98/18930, y también se hace referencia a la misma como Sp91. Una realización de la invención comprende la LytC.

15 Otra realización comprende LytX truncadas en las que "LytX" se ha definido anteriormente y "truncadas" se refiere a proteínas LytX que carecen del 50 % o más de la región de unión a Colina. Opcionalmente dichas proteínas carecen completamente de la región de unión a la colina. Otra realización más de la presente invención comprende proteínas quiméricas (o fusiones) CbpX truncada-LytX truncada. Opcionalmente esto comprende NR1 x R2 (o R1 x R2) de CbpX y la parte del extremo C (C-term, es decir, que carece de los dominios de unión a la colina) de LytX (por ejemplo, LytCCterm o Sp91Cterm). De manera opcional la CbpX se selecciona de entre el grupo que consiste en CbpA, PbcA, SpsA y PspC. Opcionalmente es CbpA. Opcionalmente, la LytX es LytC (a la que también se hace referencia como Sp91). Otra realización de la presente invención es una PspA o PsaA truncada que carece del dominio de unión a la colina (C) y que se expresa como una proteína de fusión con LytX. Opcionalmente, la LytX es la LytC.

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

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

Ejemplos de proteínas antigénicas de *Moraxella catarrhalis* que se pueden incluir en una combinación vacunal (especialmente para la prevención de la Otitis media) son OMP106 [documentos WO 97/41731 (Antex) y WO 96/34960 (PMC)]; OMP21 o fragmentos de la misma (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, y col. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [documento WO 93/03761 (Universidad de 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 de *Haemophilus influenzae* que no son clasificables o fragmentos de los mismos que se pueden incluir en una combinación vacunal (especialmente para la prevención de Otitis media) incluyen: proteína Fimbrina [(documento US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] y fusiones que comprenden un péptido de entre estos [por ejemplo, fusiones de péptido LB1(f); documentos US 5843464 (OSU) o WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (State University of Nueva York)]; TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (documento WO 94/12641); P2; y P5 (documentos WO 94/26304).

55 Las proteínas de la invención también se pueden combinar de manera beneficiosa. Por combinar se quiere decir que la composición inmunogénica comprende las proteínas en las siguientes combinaciones, sea como vehículos proteicos o como proteínas libres o como una mezcla de los dos. Por ejemplo, en una combinación de dos proteínas como se expone a continuación en el presente documento, ambas proteínas se pueden utilizar como vehículos proteicos, o ambas proteínas pueden estar presentes como proteínas libres, o ambas pueden estar presentes como vehículo y como proteína libre, o una puede estar presente como vehículo proteico y como proteína libre mientras que la otra solo está presente como un vehículo proteico o solo como proteína libre, o una puede estar presente como un vehículo proteico y la otra como proteína libre. Cuando se da una combinación de tres proteínas existen posibilidades similares. Las combinaciones incluyen, pero no se limitan a, PhtD + NR1xR2, PhtD + proteínas quiméricas o de fusión NR1xR2-Sp91Cterm, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + proteínas quiméricas o de fusión NR1xR2-Sp91Cterm, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA,

5 PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Opcionalmente, NR1xR2 (o R1xR2) es de CbpA o PspC. Opcionalmente es de CbpA. Otras combinaciones incluyen combinaciones de 3 proteínas tales como PhtD + NR1xR2 + Ply, y PhtA + NR1xR2 + PhtD. En una realización, la composición vacunal comprende neumolisina detoxificada y PhtD o PhtDE como vehículo proteico. En una realización adicional, la composición vacunal comprende neumolisina detoxificada y PhtD o PhtDE como proteínas libres.

10 En un aspecto independiente, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende al menos 4 conjugados de sacárido capsular de *S. pneumoniae* que contienen sacáridos de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* en los que al menos un sacárido se conjuga con PhtD o una proteína de fusión de la misma y la composición inmunogénica es capaz de dar lugar a una respuesta inmunitaria eficaz contra PhtD.

15 Una respuesta inmunitaria eficaz contra PhtD o una proteína de fusión de la misma se mide por ejemplo, por un ensayo de protección tal como el que se describe en el ejemplo 15. Una respuesta inmunitaria eficaz proporciona al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de supervivencia tras un desafío con una cepa heteróloga. Dado que la cepa de desafío es heteróloga, la protección que se proporciona es debida a la respuesta inmunitaria contra PhtD o una proteína de fusión de la misma.

De manera alternativa, una respuesta inmunitaria eficaz contra PhtD se mide por ELISA como se describe en el Ejemplo 14. Una respuesta inmunitaria eficaz da una respuesta de IgG anti-PhtD con una GMC de al menos 250, 300, 350, 400, 500, 550 o 600 µg/ml.

20 Por ejemplo, la composición inmunogénica comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* de diferentes serotipos conjugados con PhtD o una proteína de fusión de la misma. Por ejemplo, 22F y 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 que se seleccionan adicionalmente de entre los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 23F y 33F se conjugan con PhtD. En una realización dos o tres de los serotipos 3, 6A y 22F se conjugan con PhtD o una proteína de fusión de la misma.

25 En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende al menos un sacárido capsular de *S. pneumoniae* conjugado con PhtD o una proteína de fusión de la misma por medio de un engarce, por ejemplo ADH. En una realización, se utiliza una de las químicas de conjugación enumeradas posteriormente.

30 En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende al menos un sacárido capsular de *S. pneumoniae* conjugado con PhtD o una proteína de fusión de la misma, en la que la relación de PhtD respecto al sacárido en el conjugado es entre 6:1 y 1:5, 6:1 y 2:1, 6:1 y 2,5:1, 6:1 y 3:1, 6:1 y 3,5:1 (p/p) o es mayor (es decir, contiene una mayor proporción de PhtD) de 2,0:1, 2,5:1, 3,0:1, 3,5:1 o 4,0:1 (p/p).

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende neumolisina.

La presente invención proporciona además una vacuna que contiene las composiciones inmunogénicas de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Las vacunas de la presente invención pueden estar adyuvadas, particularmente cuando se pretende su uso en una población anciana pero también para su uso en poblaciones infantiles. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o alúmina, pero también pueden ser otras sales metálicas tales como de calcio, magnesio, hierro o zinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, sacáridos derivados catiónica o aniónicamente, o polifosfacenos.

40 El adyuvante se selecciona opcionalmente de manera que sea un inductor preferencial de una respuesta de tipo TH1. Dichos altos niveles de citocinas tipo Th-1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células contra un determinado antígeno, mientras que los altos niveles de citocinas tipo Th-2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales contra el antígeno.

45 La distinción de la respuesta inmunitaria tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad un individuo soportará una respuesta inmunitaria que se describe como que es predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citocinas en los términos que se describen en los clones de linfocitos T CD4+ve 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 tipo Th1 se asocian con la producción de INF-γ y citocinas IL-2 por los linfocitos T. Otras citocinas asociadas a menudo directamente con respuestas inmunitarias tipo Th1 no se producen por los linfocitos T, tales como la IL-12. Por el contrario, las respuestas tipo Th2 se asocian con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Los sistemas de adyuvante adecuados para promover una respuesta predominantemente Th1 incluyen: Monofosforil lípido A o una derivado del mismo (o un lípido A detoxicado en general, véase por ejemplo, el documento WO2005107798), particularmente el monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación, véase el documento GB 2220211 A); y una combinación de monofosforil lípido A, opcionalmente el monofosforil lípido A 3-des-O-acilado, junto con o bien una sal de aluminio (por ejemplo, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o una emulsión de aceite en agua. En dichas combinaciones, el antígeno y el 3D-MPL están contenidos en las mismas estructuras particuladas, permitiendo un suministro más eficaz de las señales antigénicas

e inmunoestimulantes. Los estudios han demostrado que el 3D-MPL es capaz de aumentar adicionalmente la inmunogenicidad de un antígeno adsorbido en aluminio [Thoelen y col. Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454-B1].

Un sistema mejorado implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se desvela en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactiva en la que la QS21 está inactivada con colesterol como se desvela en el documento WO 96/33739. Una formulación 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 adicionalmente una saponina, que puede ser QS21. La formulación puede comprender también una emulsión de aceite en agua y tocoferol (documento WO 95/17210). Los CpG no metilados que contienen oligonucleótidos (documento WO 96/02555) y otros oligonucleótidos inmunomoduladores (documentos WO0226757 y WO03507822) también son inductores preferenciales de una respuesta TH1 y son adecuados para su uso en la presente invención.

Los adyuvantes particulares son los que se seleccionan de entre el grupo de sales metálicas, emulsiones de aceite en agua, agonistas de receptores tipo Toll, (en particular el agonista del receptor 2 tipo Toll, agonista del receptor 3 tipo Toll, agonista del receptor 4 tipo Toll, agonista del receptor 7 tipo Toll, agonista del receptor 8 tipo Toll y agonista del receptor 9 tipo Toll), saponinas, o combinaciones de los mismos.

Un adyuvante que se puede utilizar en las composiciones vacunales de la invención son ampollas o preparaciones de vesículas de membrana externa de cepas bacterianas Gram negativas tales como las que enseña el documento WO02/09746 – particularmente ampollas de *N. meningitidis*. Las propiedades adyuvantes de las ampollas pueden estar mejoradas por la retención de LOS (lipooligosacáridos) en su superficie (por ejemplo, mediante la extracción con bajas concentraciones de detergente [por ejemplo de un 0-0,1 % de desoxicolato]). Los LOS se pueden detoxificar mediante mutaciones msbB(-) o htrB(-) como se expone en el documento WO02/09746. Las propiedades adyuvantes también se pueden mejorar por retención de PorB (y opcionalmente eliminando Por A) de las ampollas meningocócicas. Las propiedades adyuvantes también se pueden mejorar truncando la estructura de sacárido central externo de los LOS en las ampollas meningocócicas – por ejemplo, por medio de una mutación lgtB(-) como se expone en el documento WO2004/014417. De manera alternativa los LOS mencionados anteriormente (por ejemplo, aislados a partir de una cepa msbB(-) y/o lgtB(-)) se pueden purificar y utilizarlos como adyuvantes en las composiciones de la invención.

Un adyuvante adicional que se puede utilizar con las composiciones de la invención se puede seleccionar a partir del grupo de: una saponina, lípido A o un derivado del mismo, un oligonucleótido inmunoestimulante, un fosfato de alquil glucosaminida, una emulsión de aceite en agua o combinaciones de los mismos. Un adyuvante adicional que se puede utilizar con las composiciones de la invención es una sal metálica en combinación con otro adyuvante. En una realización, el adyuvante es un agonista de un receptor tipo Toll en particular un agonista de un receptor 2, 3, 4, 7, 8 o 9 tipo Toll, o una saponina, en particular QS21. En una realización, el sistema adyuvante comprende dos o más adyuvantes de la lista anterior. En particular, la combinación contiene opcionalmente un adyuvante de saponina (en particular QS21) y/o un agonista del receptor 9 tipo Toll tal como un CpG que contiene un oligonucleótido inmunoestimulante. Otras combinaciones comprenden una saponina (en particular QS21) y un agonista de receptor 4 tipo Toll tal como el monofosforil lípido A o su derivado 3 desacilado, 3D-MPL, o una saponina (en particular QS21) y un ligando del receptor 4 tipo Toll tal como un fosfato de alquil glucosaminida.

En una realización, los adyuvantes son combinaciones de 3D-MPL y QS21 (documento 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 formulados con otros vehículos (documento EP 0 689 454 B1). En una realización, los sistemas adyuvantes comprenden una combinación de 3D-MPL, QS21 y un oligonucleótido CpG como se describe en los documentos US6558670, US6544518.

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

El 3D-MPL está disponible en GlaxoSmithKline Biologicals North America y promueve primariamente las respuestas de linfocitos T CD4+ con un fenotipo de IFN- $\gamma$  (Th1). Esto puede producirse de acuerdo con los procedimientos desvelados en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En una realización, las composiciones de la presente invención utilizan pequeñas partículas de 3D-MPL. La pequeña partícula de 3D-MPL tiene un tamaño de partícula tal que puede filtrarse en esterilidad a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m. Dichas preparaciones se describen en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/21292. Se conocen derivados sintéticos del lípido A y se cree que son agonistas de TLR4 que incluyen pero no se limitan a:

OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetra-decanoilamino]-4-O-fosfono- $\beta$ -D-glucopirano-sil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]- $\alpha$ -D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (documento WO 95/14026)

OM 294 DP (3S, 9R) 3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoil amino] decano-1,10-diol, 1,10-bis (dihidrogenofosfato) (documentos WO 99/64301 y WO 00/0462)

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

5 Otros ligandos de TLR4 que se pueden utilizar son fosfatos de alquil glucosaminidas (AGP) tales como las que se desvelan en los documentos WO9850399 o US6303347 (los procedimientos para la preparación de AGP también se desvelan), o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se desvela en el documento US6764840. Algunas AGP son agonistas de TLR4, y algunas son antagonistas de TLR4. Se piensa que ambas son útiles como adyuvantes.

10 Otro inmuoestimulante para su uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina y fue descrita por primera vez en cuanto a su actividad adyuvante por Dalsgaard y col. in 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlín, p 243-254). Se han aislado por HPLC fragmentos purificados de Quil A que mantienen actividad adyuvante sin la toxicidad asociada a Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). La QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de la Quillaja saponaria  
15 IgG2a y es una saponina en el contexto de la presente invención.

Se han descrito formulaciones particulares de QS21 que son una realización de la invención, estas formulaciones comprenden además un esteroide (documento WO96/33739). Las saponinas que forman parte de la presente invención pueden estar separadas en forma de micelas, micelas mixtas (opcionalmente con sales biliares) o pueden estar en forma de matrices ISCOM (documento EP 0 109 942 B1), liposomas o estructuras coloidales relacionadas  
20 tales como complejos multiméricos tipo gusano o tipo anillo o estructuras laminadas/lipídicas y lamelares cuando se formulan con colesterol y lípidos, o en forma de una emulsión de aceite en agua (por ejemplo como en el documento WO 95/17210). Las saponinas se pueden asociar con una sal metálica tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (documento WO 98/15287).  
Opcionalmente, la saponina se presenta en forma de un liposoma, ISCOM o una emulsión de aceite en agua.

25 Un sistema mejorado implica la combinación de un monofosforil lípido A (o lípido A detoxicado) y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se desvela en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que la QS21 se inactiva con colesterol como se desvela en el documento WO 96/33739. Una formulación adyuvante particularmente potente que implica tocoferol con o sin QS21 y/o 3D-MPL en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210. En una realización, la composición inmunogénica comprende adicionalmente una saponina, que puede ser QS21.  
30

También se pueden utilizar oligonucleótidos inmuoestimulantes o cualquier agonista del receptor 9 tipo Toll (TLR). Los oligonucleótidos para su uso con adyuvantes o vacunas de la presente invención son opcionalmente CpG que contienen oligonucleótidos, opcionalmente que contienen dos o más motivos de dinucleótido CpG separados por al menos tres, opcionalmente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido Citosina seguido por  
35 un nucleótido Guanina. Los oligonucleótidos CpG de la presente invención son normalmente desoxinucleótidos. En una realización, el internucleótido del oligonucleótido es un enlace fosforoditioato, o fosfortioato, aunque están en el ámbito de la invención los enlaces fosfodiéster y otros enlaces internucleotídicos. También se incluyen en el ámbito de la invención los nucleótidos con enlaces internucleotídicos mixtos. Los procedimientos para producir oligonucleótidos con fosfortioato o fosforoditioato se describen en los documentos US5.666.153, US5.278.302 y  
40 WO95/26204.

Ejemplos de oligonucleótidos son los que tienen las siguientes secuencias. Las secuencias contienen opcionalmente uniones internucleotídicas modificadas de fosfortioato.

45 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  
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)

50 Oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias anteriores en las que haya eliminaciones o adiciones sin consecuencias en las mismas.

Los oligonucleótidos CpG que se utilizan en la presente invención se pueden sintetizar por cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo, véase el documento EP 468520). Convenientemente, dichos oligonucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador automático.

55 El adyuvante puede ser una emulsión de aceite en agua o puede comprender una emulsión de aceite en agua en combinación con otros adyuvantes. La fase oleosa del sistema de emulsión comprende opcionalmente un aceite metabolizable. El significado de la expresión aceite metabolizable se conoce bien en la técnica. Metabolizable se puede definir como que "es capaz de transformarse mediante el 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 sintético, que no sea tóxico para el receptor y que sea capaz de ser transformado por el metabolismo. Los frutos secos, semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también son parte de la presente invención y pueden incluir los aceites disponibles en el mercado tales como NEOBEE® y otros. El escualeno (2,6,10,15,19,23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón, y en bajas cantidades en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y levaduras, y es un aceite para su uso en la presente invención. El escualeno es un aceite metabolizable gracias al hecho de que es un intermediario en la biosíntesis de colesterol (índice Merck, 10ª Edición, entrada nº 8619).

Los tocoles (por ejemplo, vitamina E) se utilizan también a menudo con adyuvantes en emulsiones oleosas (documentos EP 0 382 271 B1; US5667784; WO 95/17210). Los tocoles que se utilizan en las emulsiones oleosas (opcionalmente las emulsiones de aceite en agua) de la invención se pueden formular como se describe en el documento EP 0 382 271 B1, en el que los tocoles pueden ser dispersiones de gotas de tocol, opcionalmente que comprenden un emulsionante, de opcionalmente menos de 1 micra de diámetro. De manera alternativa, los tocoles se pueden utilizar en combinación con otro aceite para formar la fase oleosa de una emulsión oleosa. Ejemplos de emulsiones oleosas que se pueden utilizar en combinación con el tocol se describen en el presente documento, tal como los aceites metabolizables descritos anteriormente.

Se ha sugerido que los adyuvantes de emulsiones de aceite en agua *per se* son útiles como composiciones adyuvantes (documento EP 0 399 843B), también se han descrito combinaciones de emulsiones de aceite en agua y otros agentes activos como adyuvantes para vacunas (documentos WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Se han descrito otros adyuvantes de emulsión oleosa, 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 emulsión oleosa (en particular cuando incorporan tocoles) para formar adyuvantes y composiciones de la presente invención.

En una realización, la emulsión oleosa (por ejemplo las emulsiones de aceite en agua) comprende además un emulsionante tal como TWEEN 80 y/o un esteroles tal como el colesterol.

En una realización, la emulsión oleosa (opcionalmente una emulsión de aceite en agua) comprende un aceite metabolizable no tóxico, tal como el escualeno, escualeno o un tocoferol tal como el alfa tocoferol (y opcionalmente tanto escualeno como tocoferol) y opcionalmente un emulsionante (o tensioactivo) tal como el Tween 80. Se puede incluir también un esteroles (por ejemplo, colesterol). El procedimiento para producir emulsiones de aceite en agua es bien conocido por el experto en la técnica. Habitualmente, el procedimiento comprende la mezcla de la fase oleosa que contiene tocol con un tensioactivo tal como una solución PBS/TWEEN80™, seguido por homogeneización utilizando un homogeneizador, estaría claro para un experto en la técnica que un procedimiento que comprende el pasaje de la mezcla dos veces a través de una aguja en una jeringa sería adecuado para homogeneizar pequeños volúmenes de líquido. Igualmente, el procedimiento de emulsión en un microfluidificador (máquina de microfluidica M110S, un máximo de 50 pasajes, durante un periodo de 2 minutos a una presión de entrada máxima de 6 bares (presión de salida de aproximadamente 850 bares)) se podría adaptar por el experto en la técnica para producir volúmenes mayores o menores de emulsión. La adaptación se podría conseguir por experimentación de rutina que comprende la medición de la emulsión resultante hasta que se consiga una preparación con gotas de aceite del diámetro necesario. En una emulsión de aceite en agua, el aceite y el emulsionante deberían estar en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tampón de fosfato.

El tamaño de las gotas de aceite que se encuentran en la emulsión de aceite en agua estable es opcionalmente menor de 1 micra, puede estar en el intervalo de sustancialmente 30-60 nm, opcionalmente sustancialmente alrededor de 30-500 nm de diámetro, y opcionalmente sustancialmente de 150-500 nm de diámetro, y en particular aproximadamente de 150 nm de diámetro según se mide por espectroscopia de correlación fotónica. A este respecto, el 80 % de las gotas de aceite en número debería encontrarse dentro de los intervalos, opcionalmente más del 90 % y opcionalmente más del 95 % de las gotas de aceite en número se encontrarían dentro de los intervalos de tamaño definidos. Las cantidades de los componentes presentes en las emulsiones oleosas de la presente invención están convencionalmente en el intervalo de desde 0,5-20 % o 2 a 10 % de aceite (del volumen total de la dosis), tal como escualeno; y, cuando están presentes, desde un 2 a un 10 % de alfa tocoferol; y desde un 0,3 a un 3 % de tensioactivo, tal como el monooleato polioxietileno de sorbitan. Opcionalmente, la relación de aceite (por ejemplo, escualeno: tocol (por ejemplo,  $\alpha$ -tocoferol) es igual o menor de 1 y esto proporciona una emulsión más estable. Un emulsionante, tal como el 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.

Ejemplos de sistemas de emulsión se describen en los documentos WO 95/17210, WO 99/11241 y WO 99/12565 que desvelan los adyuvantes de emulsión basados en escualeno,  $\alpha$ -tocoferol, y TWEEN 80, formulados opcionalmente con los inmunoestimulantes QS21 y 3D-MPL. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el adyuvante de la invención puede comprender adicionalmente inmunoestimulantes adicionales, tales como LPS o derivados de los mismos, y/o saponinas. Se describen ejemplos de inmunoestimulantes adicionales en el presente documento y en "Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M.F., y Newman, M.J., Plenum Press, Nueva York y Londres, ISBN 0-306-44867-X.

En una realización, el adyuvante y las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la invención comprenden una saponina (por ejemplo, QS21) y/o un derivado de LPS (por ejemplo, 3D-MPL) en una emulsión oleosa como se ha descrito anteriormente, opcionalmente con un esteroles (por ejemplo, colesterol). Adicionalmente, la emulsión oleosa (opcionalmente emulsión de aceite en agua) puede contener Span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina. Los adyuvantes que comprenden una emulsión de aceite en agua, un esteroles y una saponina se describen en el documento WO 99/12565.

Normalmente, para la administración a seres humanos de la saponina (por ejemplo, QS21) y/o un derivado de LPS (por ejemplo, 3D-MPL) estarán presentes en una dosis humana de composición inmunogénica en el intervalo de 1 µg – 200 µg, tal como de 10-100 µg, o 10 µg – 50 µg por dosis. Normalmente, la emulsión oleosa (opcionalmente una emulsión de aceite en agua) comprenderá desde un 2 a un 10 % de aceite metabolizable. Opcionalmente comprenderá desde un 2 a un 10 % de escualeno, desde un 2 a un 10 % de alfa tocoferol y desde un 0,3 a un 3 % (opcionalmente un 0,4 – 2 %) de emulsionante (opcionalmente Tween 80 [monooleato polioxietileno de sorbitan]). Cuando están presentes el escualeno y el alfa tocoferol, opcionalmente la relación escualeno:alfa tocoferol es igual o menor de 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. El Span 85 (trioleato de sorbitan) también puede estar presente a un nivel de un 0,5 a un 1 % en las emulsiones utilizadas en la invención. En algunos casos, puede ser ventajoso que las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención contendrán adicionalmente un estabilizante, por ejemplo otros emulsionantes/tensioactivos, incluyendo el ácido caprílico (índice Merck 10ª Edición, entrada nº 1739), por ejemplo, Tricaprilina.

Cuando se incluyen el escualeno y una saponina (opcionalmente la QS21), es beneficioso también incluir un esteroles (opcionalmente colesterol) a la formulación ya que esto permite una reducción del nivel total de aceite en la emulsión. Esto da lugar a un menor coste de fabricación, mejora de la comodidad total de la vacunación, y también se obtienen mejoras cualitativas y cuantitativas en las respuestas inmunitarias resultantes, tal como el aumento de producción de IFN-γ. En consecuencia, el sistema adyuvante de la presente invención normalmente comprende una relación de aceite metabolizable:saponina (p/p) en el intervalo de 200:1 a 300:1, también se puede utilizar la presente invención en una forma “baja en aceite” cuyo intervalo opcional es de 1:1 a 200:1, opcionalmente de 20:1 a 100:1, o sustancialmente de 48:1, esta vacuna mantiene las propiedades de adyuvante beneficiosas de todos los componentes, con un perfil de reactogenicidad mucho menor. En consecuencia, algunas realizaciones tienen una relación de escualeno:QS21 (p/p) en el intervalo de 1:1 a 250:1, o 20:1 a 200:1 o 20:1 a 100:1, o sustancialmente 48:1. Opcionalmente, también se incluye un esteroles (por ejemplo, colesterol) presente en una relación de saponina:esteroles como se ha descrito en el presente documento.

Los sistemas de emulsión de la presente invención opcionalmente tienen un tamaño de gota de aceite pequeño en el intervalo de sub-micras. Opcionalmente los tamaños de las gotas de aceite estarán en el intervalo de 120 a 750 nm, o desde 120-600 nm de diámetro.

Una formulación adyuvante particularmente potente (para la combinación en último término con AIPO4 en las composiciones inmunogénicas de la invención) implica una saponina (por ejemplo, QS21), un derivado de LPS (por ejemplo, 3D-MPL) y una emulsión oleosa (por ejemplo, escualeno y alfa tocoferol en una emulsión de 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 del Ejemplo 2, Tabla 1).

Los ejemplos de agonistas de TLR2 incluyen un peptidoglucano o lipoproteína. Las Imidazoquinolinas, tales como el Imiquimod y Resiquimod se conocen como agonistas de TLR7. El ARN de cadena sencilla también es un conocido agonista de TLR (TLR8 en seres humanos y TLR7 en ratones), mientras que el ARN de doble cadena y poli IC (ácido poliinosínico-policitidílico – un mimético sintético comercial de ARN vírico), son agonistas ejemplares de TLR3. El 3D-MPL es un ejemplo de agonista de TLR4 mientras que el CpG es un ejemplo de un agonista de TLR9.

La composición inmunogénica puede comprender un antígeno y un inmunoestimulante adsorbidos en una sal metálica. Las formulaciones vacunales basadas en aluminio en las que el antígeno y el inmunoestimulante monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) se adsorben en 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 se adsorbe entonces primero el antígeno en la sal de aluminio seguido por la adsorción del inmunoestimulante 3D-MPL en las mismas partículas de sal de aluminio. Dichos procedimientos primero implican la suspensión de 3D-MPL por sonicación en un baño de agua hasta que las partículas alcanzan un tamaño de entre 80 y 500 nm. El antígeno se adsorbe normalmente en la sal de aluminio durante una hora a temperatura ambiente con agitado. La suspensión de 3D-MPL se añade entonces al antígeno adsorbido y la formulación se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se mantiene a 4 °C hasta su uso.

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

inmunoestimulante está adsorbido en partículas de sal metálica que están sustancialmente libres de otro antígeno, y porque las partículas de sal metálica en las que está adsorbido el antígeno están sustancialmente libres de otro inmunoestimulante.

En consecuencia, la presente invención proporciona una formulación adyuvante que comprende un inmunoestimulante que se ha adsorbido en una partícula de una sal metálica, que se caracteriza porque la composición está sustancialmente libre de otro antígeno. Además, esta formulación de adyuvante puede ser intermedia de manera que, si se utiliza dicho adyuvante, se necesita para la fabricación de una vacuna. En consecuencia, se proporciona un procedimiento para la fabricación de una vacuna que comprende la mezcla de una composición adyuvante que es uno o más inmunoestimulantes adsorbidos en una partícula metálica, con un antígeno. Opcionalmente, el antígeno se ha pre-adsorbido en la sal metálica. Dicha sal metálica puede ser idéntica o similar a la sal metálica en la que se adsorbe el inmunoestimulante. Opcionalmente, la sal metálica es una sal de aluminio, por ejemplo, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

La presente invención proporciona además una composición vacunal que comprende un inmunoestimulante adsorbido en una primera partícula de una sal metálica, y un antígeno adsorbido en una sal metálica, que se caracteriza porque la primera y segunda partículas de sal metálica son partículas distintas.

Los derivados de LPS o LOS o las mutaciones o los derivados de lípido A descritos en el presente documento se diseñan para que sean menos tóxicos (por ejemplo, 3D-MPL) que los lipopolisacáridos nativos y son equivalentes que se pueden intercambiar con respecto a cualquiera de los usos de estos restos que se describen en el presente documento.

En una realización, el adyuvante que se utiliza para las composiciones de la invención comprende un vehículo liposoma (fabricado por técnicas conocidas a partir de un fosfolípido (tal como la dioleoil fosfatidil colina [DOPC]) y opcionalmente un esteroil [tal como el colesterol]). Dichos vehículos liposómicos pueden llevar derivados de lípido A [tal como 3D-MPL – véase anteriormente] y/o saponinas (tal como QS21 – véase anteriormente). En una realización el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 0,1-10 mg, 0,2-7, 0,3-5, 0,4-2, o 0,5-1 mg (por ejemplo, 0,4-0,6, 0,9-1,1, 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, 0,2 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 adecuado para formulaciones vacunales para ancianos. En una realización la composición vacunal que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacáridos derivados de al menos todos los siguientes serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (y puede comprender también uno o más de los serotipos 3, 6A, 19A, y 22F), en los que el título de GMC de anticuerpo inducido contra uno o más (o todos) los componentes vacunales 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no sea significativamente inferior al inducido por la vacuna *Prevnar*® en seres humanos vacunados.

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

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

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

Este adyuvante puede contener opcionalmente 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3, o 0,125-0,25 mg (por ejemplo, 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 o 0,125 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 adecuado para formulaciones vacunales para ancianos. En una realización la composición vacunal que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacáridos 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 GMC de anticuerpo que se induce contra uno o más (o todos) los componentes vacunales 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior que los que induce la vacuna *Prevnar*® en seres humanos vacunados.

En una realización, el adyuvante que se utiliza 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, 400-500 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).

5 Este adyuvante es particularmente adecuado para formulaciones vacunales infantiles y para ancianos. En una realización la composición vacunal que comprende este adyuvante comprende conjugados de sacáridos 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 la GMC de anticuerpo que se induce contra uno o más (o todos) los componentes vacunales 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior a los que induce la vacuna *Prevnar*® en seres humanos vacunados.

10 Las preparaciones vacunales que contienen las composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden utilizar para proteger o tratar un mamífero susceptible a la infección, por medio de la administración de dicha vacuna por vía sistémica o vía mucosa. Estas administraciones pueden incluir la inyección por medio de la vía intramuscular (IM), intraperitoneal (IP), intradérmica (ID) o subcutánea (SC); o la administración por vía mucosa en los tractos oral/alimentario, respiratorio genitourinario. La administración intranasal (IN) de las vacunas para el tratamiento de la neumonía o la Otitis media es posible (ya que el transporte nasofaríngeo de neumococos se puede evitar más eficazmente, atenuando de esta manera la infección en su estadio más temprano). Aunque la vacuna de la invención se puede administrar como una dosis única, los componentes de la misma también se pueden co-administrar juntos al mismo tiempo o en diferentes tiempos (por ejemplo, se podrían administrar los conjugados de sacáridos neumocócicos por separado, al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de cualquier componente proteico de la vacuna, para la coordinación óptima de las respuestas inmunitarias con respecto a cada uno de ellos). Para la co-administración, el adyuvante Th1 opcional puede estar presente en todas y cada una de las diferentes administraciones. Además de una única vía de administración, se pueden utilizar 2 vías diferentes de administración. Por ejemplo, los sacáridos o conjugados de sacárido se pueden administrar IM (o ID) y las proteínas bacterianas se pueden administrar IN (o ID). Además, las vacunas de la invención pueden administrarse por vía IM para las dosis de sensibilización e IN para las dosis de refuerzo.

20 El contenido de proteínas antigénicas en la vacuna estará normalmente en el intervalo de 1-100 µg, opcionalmente 5-50 µg, por ejemplo en el intervalo de 5-25 µg. Después de la vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas adecuadamente.

30 La preparación de vacunas se describe en general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). La encapsulación en liposomas se describe por Fullerton, Patente de EE. UU. 4.235.877.

35 Las vacunas o composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden almacenar en solución o liofilizadas. En una realización, la solución se liofiliza en presencia de un azúcar que actúa como un lioprotector amorfo, tal como sacarosa, trealosa, glucosa, manosa, maltosa, o lactosa. En una realización, la solución se liofiliza en presencia de un azúcar que actúa como un lioprotector amorfo, y un agente de carga que proporciona una mejor estructura aglomerada tal como glicina o manitol. La presencia de un agente de carga cristalino permite acortar los ciclos de secado por congelación, en presencia de una alta concentración de sal. Ejemplos de dichas mezclas para su uso en la liofilización de las composiciones inmunogénicas o vacunas de la invención incluyen sacarosa/glicina, trealosa/glicina, glucosa/glicina, manosa/glicina, maltosa/glicina, sacarosa/manitol, trealosa/manitol, manosa/manitol y maltosa/manitol. Normalmente, la relación molar de dos constituyentes es opcionalmente de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o 1:6. Las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden opcionalmente los reactivos de liofilización que se han descrito anteriormente.

45 Los agentes estabilizadores anteriores y mezclas de agentes estabilizadores pueden incluir adicionalmente un polímero capaz de aumentar la temperatura de transición de cristales ( $T_g$ ) de la formulación, tal como poli(vinilpirrolidona) (PVP), hidroxietil almidón o dextrano, o un polímero que actúe como un agente de volumen cristalino tal como polietilenglicol (PEG), por ejemplo que tenga un peso molecular entre 1500 y 6000, y dextrano.

50 Las composiciones inmunogénicas de la invención opcionalmente se liofilizan y se reconstituyen extemporáneamente antes de su uso. La liofilización puede dar como resultado una composición (vacuna) más estable y puede dar lugar posiblemente a títulos de anticuerpo más altos en presencia de 3D-MPL y en ausencia de un adyuvante basado en aluminio.

55 En un aspecto de la invención se proporciona un kit vacunal, que comprende un vial que contiene una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente en forma liofilizada, y que comprende adicionalmente un vial que contiene un adyuvante como se ha descrito en el presente documento. Se prevé que en este aspecto de la invención, el adyuvante se utilizará para reconstituir la composición inmunogénica liofilizada.

Aunque las vacunas de la presente invención se pueden administrar por cualquier vía, la administración de las vacunas en la piel (ID) forma una realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula "cornificada" externa, llamado estrato córneo, que recubre la epidermis. Bajo esta epidermis hay una capa llamada

dermis que a su vez recubre el tejido subcutáneo. Los investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna en la piel, y en particular la dermis, estimula una respuesta inmunitaria, que se puede asociar con varias ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en la presente invención forma una característica opcional de la presente invención.

5 La técnica convencional de inyección intradérmica, el “procedimiento Mantoux”, comprende las etapas de limpiar la piel y entonces estirarla con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre estrecho (calibre 26-31) dirigido hacia arriba, insertar la aguja con un ángulo de entre 10-15°. Una vez que se inserta el bisel, se baja el barril de la aguja y se avanza adicionalmente mientras se aplica una ligera presión para elevarla bajo la piel. El líquido se inyecta muy lentamente formando una vesícula o ampolla en la superficie de la piel, seguido por la lenta retirada de la aguja.

10 Más recientemente, se han descrito dispositivos que se han diseñado específicamente para administrar agentes líquidos en o a través de la piel, por ejemplo, los dispositivos que se describen en los documentos WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección por aire a presión 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 intradérmica de las preparaciones vacunales pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para suministro balístico de vacunas sólidas (documento WO 99/27961), o parches transdérmicos (documentos WO 97/48440; WO 98/28037); o se aplican en la superficie de la piel (suministro transdérmico o transcutáneo, documentos WO 98/20734; WO 98/28037).

20 Cuando las vacunas de la presente invención se van a administrar en la piel, o más específicamente en la dermis, la vacuna tendrá un volumen bajo de líquido, particularmente, un volumen de entre aproximadamente 0,05 ml y 0,2 ml.

El contenido de antígenos en las vacunas de piel o intradérmicas de la presente invención puede ser similar al de las dosis convencionales que se encuentran en las vacunas intramusculares (véase anteriormente). Sin embargo, es una característica de las vacunas de piel o intradérmicas que las formulaciones puedan ser de “dosis baja”. En consecuencia las proteínas antigénicas en las vacunas de “dosis baja” están presentes opcionalmente tan poco como de 0,1 a 10 µg o 0,1 a 5 µg por dosis; y los sacáridos antigénicos (opcionalmente conjugados) pueden estar presentes en el intervalo de 0,01-1 µg de sacárido por dosis.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “suministro intradérmico” significa el suministro de la vacuna en la región de la dermis de la piel. Sin embargo, la vacuna no se localizará necesariamente exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa de piel localizada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm de la superficie en la piel humana, pero hay cierta cantidad de variación entre los individuos y en las diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar que se alcance la dermis a 1,5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis se localiza entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea por debajo. Dependiendo del modo de suministro, la vacuna se puede localizar solamente o primariamente en la dermis, o en último término se puede distribuir en la epidermis y la dermis.

La presente invención proporciona además una vacuna mejorada para la prevención o mejora de la Otitis media producida por *Haemophilus influenzae* por la adición de proteínas de *Haemophilus influenzae*, por ejemplo la proteína D en forma de conjugado. Además, la presente invención proporciona adicionalmente una vacuna mejorada para la prevención o mejora de la infección neumocócica en bebés (por ejemplo, Otitis media), basándose en la adición de una o dos proteínas neumocócicas como proteínas libres o conjugadas a las composiciones de conjugados de *S. pneumoniae* de la invención. Dichas proteínas neumocócicas libres pueden ser la misma o diferente de las proteínas de *S. pneumoniae* que se utiliza como vehículo proteico. También se pueden incluir una o más proteínas antigénicas de *Moraxella catarrhalis* en la combinación vacunal en forma libre o conjugada.

45 Realizaciones adicionales de la presente invención incluyen la provisión de las composiciones de conjugados de *S. pneumoniae* antigénicas de la invención para su uso en medicina y el uso de conjugados de *S. pneumoniae* de la invención en la fabricación de un medicamento para la prevención (o tratamiento) de enfermedad neumocócica.

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

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

Las expresiones “que comprende”, “comprender” y “comprende” en el presente documento, según pretenden los inventores se pueden sustituir opcionalmente con las expresiones “que consiste en”, “consistir en” y “consiste en”, respectivamente en cada caso.

Las realizaciones del presente documento que se refieren a “composiciones vacunales” de la invención también son aplicables a las realizaciones que se refieren a “composiciones inmunogénicas” de la invención y viceversa.

Con el fin de que se entienda mejor la presente invención, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solamente con fines ilustrativos, y no se tienen que considerar como limitantes del ámbito de la invención de ninguna manera.

**Ejemplos**

**5 Ejemplo 1: EXPRESIÓN DE PROTEÍNA D**

**Proteína D de *Haemophilus influenzae***

**Construcción genética para la expresión de proteína D**

**Materiales de partida**

**ADN que codifica la proteína D**

10 La proteína D está altamente conservada entre todos los serotipos y cepas no tipables de *H. influenzae*. El vector pHIC348 que contenía la secuencia genética de ADN que codifica la proteína D completa obtuvo del Dr. A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmö General Hospital, Malmö, Suecia. La secuencia de ADN de la proteína D se ha publicado por Janson y col. (1991) Infect. Immun. 59: 119-125.

**Vector de expresión pMG 1**

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

**Cepa AR58 de *E. coli***

20 La cepa AR58 de *E. coli* se generó por transducción de la N99 con un fago P1 de reserva previamente cultivado en un derivado de SA500 (galE::TN10, lambdakil- cI857 ΔH1). N99 y SA500 son cepas de *E. coli* K12 derivadas por el Dr. Martin en el laboratorio Rosenberg del Instituto Nacional de la Salud.

**Vector de Expresión pMG 1**

25 Para la producción de proteína D, se clonó el ADN que codifica la proteína en el vector de expresión pMG 1. Este plásmido utiliza señales del ADN del fago lambda para dirigir la transcripción y traducción de los genes ajenos insertados. El vector contiene el promotor PL, operador OL, y dos sitios de utilización (NutL y NutR) para aliviar los efectos de la polaridad transcripcional cuando se proporciona la proteína N (Gross y col., 1985). Los vectores que contienen el promotor PL, se introducen en un huésped lisogénico *E. coli* para estabilizar el ADN plasmídico. Las cepas huésped lisogénicas contienen un ADN de fago lambda defectuoso en replicación integrado en el genoma (Shatzman y col., 1983). El ADN de fago lambda cromosómico dirige la síntesis de la proteína represora cI que se une al represor de OL del vector y evita la unión de la ARN polimerasa al promotor PL y de esta manera la transcripción del gen insertado. El gen de expresión cI de la cepa AR58 contiene una mutación sensible a la temperatura de manera que se puede regular la transcripción dirigida de PL por un cambio de temperatura, es decir, un aumento de la temperatura del cultivo inactiva el represor y se inicia la síntesis de la proteína ajena. Este sistema de expresión permite la síntesis controlada de proteínas ajenas especialmente las que pueden ser tóxicas para la célula (Shimataka & Rosenberg, 1981).

**Cepa AR58 de *E. coli***

35 La cepa lisogénica AR58 de *E. coli* que se utiliza para la producción del vehículo proteína D es un derivado de la cepa N99 de la *E. coli* NIH K12 convencional (F- su- galK2, lacZ- thr-). Contiene un fago lisogénico defectuoso (galE::TN10, lambdakil-cI857 ΔH1). El fenotipo Kil<sup>-</sup> evita la interrupción de síntesis macromolecular del huésped. La mutación cI857 confiere una alteración al represor cI sensible a la temperatura. La eliminación ΔH1 elimina el operón directo del fago lambda y los loci bio, uvr3, y chlA del huésped. La cepa AR58 se generó por transducción de N99 con un fago P1 de reserva cultivado previamente en un derivado de SA500 (galE::TN10, lambdakil- cI857 ΔH1). La introducción del lisogén defectuoso en N99 se seleccionó con tetraciclina gracias a la presencia de un transposón TN10 que codifica resistencia a la tetraciclina en el gen galE adyacente.

**45 Construcción del vector pMGMDPPrD**

El vector pMG 1 que contiene el gen que codifica la proteína S1 no estructural del virus de gripe (pMGNSI) se utilizó para construir el pMGMDPPrD. El gen de la proteína D se amplificó por PCR a partir del vector pHIC348 (Janson y col. 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 el pMGNS1 entre NcoI y XbaI creando así una proteína de fusión que contiene que contienen los 81 aminoácidos del extremo N de la proteína NS1 seguidos por la proteína PD. Este vector se marcó como pMGNS1PrD. Basándose en la construcción descrita anteriormente se generó la construcción final para la expresión de proteína D. Se retiró un fragmento BamHI/BamHI

del pMGNS1PrD. Esta hidrólisis del ADN elimina la región codificante NS1, excepto los tres primeros restos del extremo N. Tras volver a unir el vector se genera un gen que codifica una proteína de fusión con la secuencia que se muestra en el documento WO 07/71711, ejemplo 1, página 44.

5 La proteína D no contiene un péptido líder o una cisteína en el extremo N a los que normalmente se unen las cadenas lipídicas. La proteína por lo tanto ni se excreta al periplasma ni se lipida y permanece en el citoplasma en forma soluble.

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

La expresión de la proteína D está bajo el control del promotor P<sub>L</sub> lambda/operador O<sub>L</sub>. La cepa huésped AR58 contiene un gen *ci* sensible a la temperatura en el genoma que bloquea la expresión de P<sub>L</sub> lambda a baja temperatura mediante la unión con O<sub>L</sub>. Una vez que la temperatura se eleva se libera el *ci* del O<sub>L</sub> y se expresa la proteína D.

#### 15 *Preparación a pequeña escala*

Al final de la fermentación, las células se concentraron y se congelaron.

20 La extracción de las células recolectadas y la purificación de la proteína D se llevó a cabo de la siguiente manera. El aglomerado congelado del cultivo celular se descongeló y se re-suspendió en una solución de disrupción (tampón de citrato pH 6,0) hasta una DO<sub>650</sub> final = 60. La suspensión se pasó dos veces a través de un homogeneizador de alta presión a P = 1000 bares. El homogenizado del cultivo celular se clarificó por centrifugación y se retiraron los desechos celulares por filtración. En la primera etapa de purificación el lisado filtrado se aplicó en una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose de flujo rápido). La PD se une a la matriz de gel por interacción iónica y se eluye en una etapa de aumento de la fuerza iónica del tampón de elución.

25 En una segunda etapa de purificación, se retienen las impurezas en una matriz de intercambio aniónico (Sepharose Q de flujo rápido). La PD no se une en el gel y se puede recolectar en el flujo que pasa.

En ambas etapas de cromatografía en columna la recolección de las fracciones se controla por DO. El flujo a través de la columna de cromatografía de intercambio aniónico que contenía la proteína D purificada se concentra por ultracentrifugación.

El retenido de la ultrafiltración que contiene la proteína D se pasa finalmente por una membrana de 0,2 µm.

#### 30 *Preparación a gran escala*

La extracción de las células recolectadas y la purificación de la proteína D se llevó a cabo de la siguiente manera. El caldo recolectado se enfría y se pasa directamente dos veces a través de un homogeneizador a alta presión a una presión de alrededor de 800 bares.

35 En la primera etapa de purificación el homogenizado del cultivo celular se diluye y se aplica en una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose de perlas grandes). La PD se une a la matriz de gel por interacción iónica y se eluye por una etapa de aumento de la fuerza iónica del tampón de elución y se filtra.

En una segunda etapa de purificación las impurezas se retienen en una matriz de intercambio aniónico (Q Sepharose de flujo rápido). La PD no se une al gel y se puede recolectar en el flujo que pasa.

40 En ambas etapas de cromatografía en columna la fracción de recolección se controla por DO. El flujo a través de la columna de cromatografía de intercambio aniónico que contiene la proteína D purificada se concentra y se diafiltra por ultrafiltración.

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

#### **Ejemplo 1b: Expresión de PhtD**

45 La proteína PhtD es un miembro de la familia de proteínas neumocócicas de tríadas de histidina (Pht) que se caracteriza por la presencia de tríadas de histidina (motivo HXXHXH). La PhtD es una molécula de 838 aminoácidos y alberga 5 tríadas de histidina (véase, MedImmune, documento WO00/37105, SEQ ID NO: 4 para la secuencia de aminoácidos y SEQ ID NO: 5 para la secuencia de ADN). La PhtD también contiene una región rica en prolina en el centro (posición de aminoácidos 348-380). La PhtD tiene una secuencia de señal en el extremo N de 20 aminoácidos con un motivo LXXC.

50

### Construcción genética

La secuencia genética de la proteína PhtD MedImmune madura (desde el aminoácido 21 al aminoácido 838) se transfirió recombinantemente a *E. coli* utilizando el vector pTCMP14 del laboratorio que alberga el promotor pL. La cepa huésped de *E. coli* es la AR58, que porta el represor cI857 termosensible, que permite la inducción por calor del promotor.

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el gen phtD a partir del plásmido MedImmune (que alberga el gen phtD de la cepa Norway 4 de *Streptococcus pneumoniae* (serotipo 4) - SEQ ID NO: 5 como se describe en el documento WO 00/37105). Los cebadores, específicos solo para el gen phtD, se utilizaron para amplificar el gen phtD en dos fragmentos. Los cebadores albergan o bien los sitios de restricción NdeI y KpnI o el KpnI y XbaI. Estos cebadores no se hibridan con ningún nucleótido del vector sino solamente con las secuencias genéticas específicas de phtD. Se insertó un codón de inicio ATG artificial utilizando el primer cebador que alberga el sitio de restricción NdeI. Los productos PCR generados se insertaron entonces en el vector de clonación pGEM-T (Promega), y se confirmó la secuencia de ADN. Entonces se llevó a cabo la sub-clonación de los fragmentos en el vector de expresión TCMP14 utilizando técnicas convencionales y se transformó el vector en *E. coli* AR58.

### Purificación de PhtD

La purificación de PhtD se consiguió de la siguiente manera:

- Cultivo de las células de *E. coli* en presencia de Kanamicina: cultivo 30 horas a 30 °C y después la inducción durante 18 horas a 39,5 °C.
- Rotura de las células *E. coli* del cultivo completo a una DO de  $\pm 115$  en presencia de EDTA 5 mM y PMSF 2 mM como inhibidores de proteasas: Rannie, 2 pasajes, 1000 bares.
- Captura de antígeno y retirada de los desechos celulares por cromatografía en un lecho modo expandido Streamline Q XL a temperatura ambiente (20 °C); la columna se lava con NaCl 150 mM + Empigen al 0,25 % pH 6,5 y se eluye con NaCl 400 mM + Empigen al 0,25 % en 25 mM de tampón fosfato potásico pH 7,4.
- Filtración en un cartucho Sartobran 150 (0,45 + 0,2  $\mu$ m).
- Unión del antígeno en cromatografía sobre Sepharose quelante Zn<sup>++</sup> FF IMAC a pH 7,4 en presencia de 5 mM de imidazol a 4 °C; la columna se lavó con Imidazol 5 mM y Empigen al 1 % y se eluyó con 50 mM de imidazol, ambos en 25 mM de tampón de fosfato potásico pH 8,0.
- Cromatografía de intercambio aniónico débil en modo positivo sobre Fractogel EMD DEAE a pH 8,0 (fosfato potásico 25 mM) a 4 °C; la columna se lavó con 140 mM de NaCl y se eluyó con 200 mM de NaCl mientras que los contaminantes (proteínas y ADN) permanecieron adsorbidos en el intercambiador.
- Concentración y ultrafiltración con 2 mM de fosfato Na/K, pH 7,15 en una membrana de 50 kDa.
- Esterilización por filtración del volumen purificado en un cartucho filtro de 0,2  $\mu$ m Millipak-20.

### Ejemplo 1c: Expresión de neumolisina

Se preparó la neumolisina neumocócica y se detoxicó como se describe en los documentos WO2004/081515 y WO2006/032499.

### Ejemplo 2

#### Preparación de conjugados

Se conoce bien en la técnica cómo fabricar polisacáridos neumocócicos purificados. Para los fines de estos ejemplos los polisacáridos se fabricaron esencialmente como se describe en el documento EP072513 o por procedimientos estrechamente relacionados. Antes de la conjugación los polisacáridos se pueden modificar de tamaño por microfluidificación como se describe posteriormente.

La activación y las condiciones de acoplamiento son específicas para cada polisacárido. Se dan en la Tabla 1. El polisacárido modificado de tamaño (excepto para PS5, 6B y 23F) se disolvió en NaCl 2 M, NaCl 0,2 M o en agua para inyección (API). La concentración óptima de polisacárido se evaluó para todos los serotipos. Todos los serotipos excepto el serotipo 18C se conjugaron directamente con el vehículo proteico como se detalla posteriormente. Se fabricaron dos conjugados alternativos del serotipo 22F; uno conjugado directamente, y el otro mediante un engarce ADH.

A partir de una solución de materia prima de 100 mg/ml de solución en acetonitrilo o acetonitrilo/agua 50%/50 %, se añadió CDAP (relación CDAP/PS de 0,5-1,5 mg/mg PS) a la solución de polisacárido. 1,5 minutos más tarde, se añadió NaOH 0,2 M-0,3 M para obtener el pH específico de activación. Se llevó a cabo la activación del polisacárido



a este pH durante 3 minutos a 25 °C. La proteína purificada (proteína D, PhtD, neumolisina o DT) (en una cantidad que depende de la relación vehículo proteico/PS inicial) se añadió al polisacárido activado y la reacción de acoplamiento se llevó a cabo al pH específico durante hasta 2 horas (dependiendo del serotipo) con regulación de pH. Con el fin de inactivar los grupos de éster de cianato que no reaccionaron, se añadió entonces a la mezcla una solución de 2 M de glicina. El pH se ajustó al pH de inactivación (pH 9,0). La solución se agitó durante 30 minutos a 25 °C y después una noche a 2-8 °C con agitado lento continuo.

#### Preparación de 18C

El 18C se unió a un vehículo proteico por medio de un engarce dihidracida del ácido adípico (ADH). El polisacárido del serotipo 18C se microfluidificó antes de la conjugación.

#### 10 **Derivación de toxoide tetánico con EDAC**

Para la derivación del toxoide tetánico, se diluyó el TT purificado a 25 mg/ml en 0,2 M de NaCl y se añadió el espaciador ADH con el fin de alcanzar una concentración final de 0,2 M. Cuando la disolución del espaciador estaba completa, se ajustó el pH a 6,2. Entonces se añadió el EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida) hasta alcanzar una concentración final de 0,02 M y la mezcla se agitó durante 1 hora bajo regulación de pH. La reacción de condensación se paró aumentando el pH hasta 9,0 durante al menos 30 minutos a 25 °C. El TT derivado se diafiltró entonces (membrana CO de 10 kDa) con el fin de retirar el ADH y reactivo EDAC residuales.

El volumen de TT<sub>AH</sub> finalmente se esterilizó por filtración hasta la etapa de acoplamiento y se almacenó a -70 °C.

#### **Acoplamiento químico de TT<sub>AH</sub> al PS 18C**

Los detalles de los parámetros de conjugación se pueden encontrar en la Tabla 1. Se diluyeron 2 gramos de PS microfluidificado a la concentración definida en agua y se ajustó a 2 M de NaCl por adición de NaCl en polvo.

Se añadió la solución de CDAP (100 mg/ml preparada recientemente en un 50/50 v/v de acetonitrilo/API) para alcanzar la relación CDAP/PS apropiada.

El pH se aumentó hasta el pH de activación de pH 9,0 por la adición de 0,3 M de NaOH y se estabilizó a este pH hasta la adición de TT<sub>AH</sub>.

25 Tras 3 minutos, se añadió el TT<sub>AH</sub> derivado (20 mg/ml en 0,2 M de NaCl) hasta alcanzar una relación TT<sub>AH</sub>/PS de 2; se reguló el pH al pH de acoplamiento pH 9,0. La solución se dejó una hora a pH de regulación.

Para la inactivación, se añadió una solución de glicina 2 M a la mezcla PS/TT<sub>AH</sub>/CDAP.

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

La solución se agitó durante 30 min a 25 °C, y luego se dejó en reposo durante una noche a 2-8 °C.

#### 30 Conjugado PS22F<sub>AH</sub>-PhtD

En un segundo procedimiento de conjugación para este sacárido (siendo el primero el procedimiento de conjugación PS22-PhtD directo que se muestra en la Tabla 1), se unió el 22F al vehículo proteico mediante un engarce dihidracida del ácido adípico (ADH). El polisacárido del serotipo 22F se microfluidificó antes de la conjugación.

#### **Derivación del PS 22F**

35 La activación y acoplamiento se llevaron a cabo a 25 °C con agitado continuo en un baño de agua con temperatura controlada.

El PS 22F microfluidificado se diluyó para obtener una concentración final de PS de 6 mg/ml en 0,2 M de NaCl y la solución se ajustó a un pH de 6,05 ± 0,2 con HCl 1 N.

40 La solución CDAP (100 mg/ml recién preparada en acetonitrilo/API, 50/50) se añadió hasta alcanzar la relación CDAP/PS apropiada (1,5/1 p/p).

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

Tras 3 minutos, se añadió la ADH hasta alcanzar la relación ADH/PS apropiada (8,9/1 p/p); el pH se reguló a pH de acoplamiento 9,0. La solución se dejó en reposo durante 1 hora a pH de regulación.

45 El derivado PS<sub>AH</sub> se concentró y diafiltró.

Acoplamiento

5 Se añadió la PhtD a 10 mg/ml en 0,2 M de NaCl al derivado PS 22F<sub>AH</sub> con el fin de alcanzar una relación PhtD/PS22F<sub>AH</sub> de 4/1 (p/p). Se ajustó el pH a  $5,0 \pm 0,05$  con HCl. La solución EDAC (20 mg/ml en 0,1 M de Tris-HCl pH 7,5) se añadió manualmente en 10 min (250  $\mu$ l/min) hasta alcanzar 1 mg EDAC /mg de PS22F<sub>AH</sub>. La solución resultante se incubó durante 150 min (también se utilizó durante 60 minutos) a 25 °C con agitado y regulación de pH. La solución se neutralizó por adición de 1 M de Tris-HCl pH 7,5 (1/10 del volumen final) y se dejó en reposo 30 min a 25 °C.

Antes de la elución en Sephacryl S400HR, el conjugado se clarificó utilizando un filtro Minisart de 5  $\mu$ m.

10 El conjugado resultante tiene una relación PhtD/PS final de 4:1 (p/p), un contenido de PS libre por debajo del 1 % y una antigenicidad ( $\alpha$ -PS/ $\alpha$ -PS) del 36,3 % y una antigenicidad anti-PhtD del 7,4 %. La relación de proteína y polisacárido se midió utilizando los procedimientos Lowry y Resorcinol y se determinó la antigenicidad utilizando un ELISA sándwich.

Purificación de los conjugados

15 Los conjugados se purificaron por filtración en gel utilizando una columna de filtración en gel Sephacryl S400HR equilibrada con 0,15 M de NaCl (S500HR para 18C) para eliminar las moléculas pequeñas (incluyendo DMAP) y PS y proteína no conjugados. Basándose en los diferentes tamaños moleculares de los componentes de la reacción, los conjugados PS-PD, PS-TT, PS-PhtD, PS-neumolisina o PS-DT se eluyen primero, seguidos por el PS libre, luego el PD libre o DT libre y finalmente DMAP y otras sales (NaCl, glicina).

20 Las fracciones que contenían los conjugados se detectan por UV<sub>280</sub> nm. Las fracciones se agruparon de acuerdo con su K<sub>d</sub>, se esterilizó por filtración (0,22  $\mu$ m) y se almacenó a +2-8 °C. Se determinaron las relaciones PS/Proteína de las preparaciones de conjugado.

**Condiciones de activación/acoplamiento/inactivación específicas para los conjugados de PS de *S. pneumoniae*-Proteína D/DT/PhtD/Ply**

25 Cuando aparece “ $\mu$ fluid” en una fila de títulos, indica que el sacárido se modificó de tamaño por microfluidificación antes de la conjugación. Los tamaños de los sacáridos tras la microfluidificación se dan en la Tabla 2.

Tabla 1 Condiciones de activación/acoplamiento/inactivación de los conjugados de PS de *S. pneumoniae*-Proteína D/TT/DT/PhD/PIy

<b>Serotipo</b>	<b>1 µfluid</b>	<b>4 µfluid</b>	<b>5</b>	<b>6A</b>	<b>6B</b>	<b>7F µfluid</b>	
<b>Conc. PS (mg/ml)</b>	2,5	2,5	7,1	5,0	5,0	5,0	
<b>Disolución PS</b>	API	API	API	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	
<b>Conc. PD (mg/ml)</b>	10,0	10,0	5,0	5,0	5,0	10,0	
<b>Relación inicial PD/PS (p/p)</b>	1,5/1	1,5/1	1/1	1/1	1,1/1	1,2/1	
<b>Conc. CDAP (mg/mg PS)</b>	0,50	0,50	0,79	0,83	0,83	0,75	
<b>pH<sub>a</sub>=pH<sub>c</sub>=pH<sub>q</sub></b>	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	
<b>Serotipo</b>	<b>9V µfluid</b>	<b>14 µfluid</b>	<b>18C µfluid</b>	<b>19A µfluid</b>	<b>19F µfluid</b>	<b>22F µfluid</b>	<b>23F</b>
<b>Conc. PS (mg/ml)</b>	5,0	5,0	4,5	15,0	9,0	6,0	2,38
<b>Disolución PS</b>	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 0,2 M	NaCl 2 M
<b>Conc. vehículo proteico (mg/ml)</b>	10,0	10,0	20,0 (TT)	10,0 (PIy)	20,0 (DT)	10,0 (PhD)	5,0
<b>Relación inicial vehículo proteico/PS (p/p)</b>	1,2/1	1,2/1	2/1	2,5/1	1,5/1	3/1	1/1
<b>Conc. CDAP (mg/mg PS)</b>	0,50	0,75	0,75	1,5	1,5	1,5	0,79
<b>pH<sub>a</sub>=pH<sub>c</sub>=pH<sub>q</sub></b>	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0

Nota: pH<sub>a</sub>, pH<sub>c</sub>, pH<sub>q</sub> corresponden al pH de activación, acoplamiento e inactivación, respectivamente

**Caracterización:**

Cada conjugado se caracterizó y cumplía las especificaciones descritas en la Tabla 2. El contenido de polisacárido ( $\mu\text{g/ml}$ ) se midió por el ensayo de Resorcinol y el contenido en proteína ( $\mu\text{g/ml}$ ) por el ensayo Lowry. La relación final PS/PD (p/p) se determinó por la relación de las concentraciones.

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

El contenido de polisacárido libre de los conjugados mantenidos a 4 °C o almacenados 7 días a 37 °C se determinó en el sobrenadante obtenido tras la incubación con anticuerpos  $\alpha$ -vehículo proteico y sulfato de amonio saturado, seguido por centrifugación.

10 Se utilizó un ELISA  $\alpha$ -PS/ $\alpha$ -PS para la cuantificación de polisacárido libre en el sobrenadante. La ausencia de conjugado se controló también por un ELISA  $\alpha$ -PS y  $\alpha$ -vehículo proteico, respectivamente.

**Antigenicidad:**

Se analizó la antigenicidad en los mismos conjugados con un ELISA tipo sándwich en el que la captura y la detección de anticuerpos eran  $\alpha$ -PS y  $\alpha$ -Proteína, respectivamente.

**Contenido en proteína libre (%):**

15 El vehículo proteico no conjugado se puede separar del conjugado durante la etapa de purificación. El contenido de proteína libre residual se determinó utilizando una cromatografía de exclusión por tamaño (TSK 5000-PWXL) seguido por detección por UV (214 nm). Las condiciones de elución permitían la separación de vehículo proteico libre y el conjugado. El contenido en proteína libre en el volumen de conjugado se determinó entonces frente a una curva de calibración (de 0 a 50  $\mu\text{g/ml}$  de vehículo proteico). El vehículo proteico libre en % se obtuvo de la siguiente manera: % vehículo libre = (vehículo libre ( $\mu\text{g/ml}$ ) / (concentración total del correspondiente vehículo proteico medido por Lowry ( $\mu\text{g/ml}$ ) \* 100 %).

**Estabilidad:**

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

25 La caracterización de los de 10/11/13/14 valencias se da en la Tabla 2 (véase el comentario por debajo). Los conjugados proteicos se pueden adsorber en fosfato de aluminio y agruparse para formar la vacuna final.

TABLA 2 – Características de los conjugados

Conjugados	Tamaño de PS (Da x 10 <sup>3</sup> )	Relación vehículo/PS Ratio	PS Libre (Elisa)	Vehículo libre	Antigenicidad del PS (Elisa)	Tamaño del Conj. (kDa)
PS1-PD	349-382*	1,5-1,6	1,0 %-1,2 %	3,9 %-4,8 %	87 %-95 %	1499-1715
PS4-PD	93-100*	1,5-1,6	4,7-6,5 %	3,2 %-4,0 %	90 %-96 %	1303-1606
PS5-PD***	367-443	0,80	8,7-11,2 %	2,2 %-3,8 %	93 %-108 %	1998-2352
PS6A-PD	1100-1540	0,61	4,5 %	ND	45,9 %	ND
PS6B-PD***	1069-1391	0,7-0,8	1,3-1,6 %	<2,0 %	68 %-75 %	4778-5235
PS7F-PD	255-264*	1,1-1,2	<1 %	<1,4 %	58 %	3907-4452
PS9V-PD	258-280*	1,3-1,5	<1 %	<1,3 %	67 %-69 %	9073-9572
PS14-PD	232-241*	1,4	<1 %	<1,5 %	70 %	3430-3779
PS 18C-TT	89-97*	2,2-2,4	1,5-2,2 %	<4 %	46 %-56 %	5464-6133
PS19A-Ply*	151	3,2	<1 %		29 %	
PS19F-DT	133-143*	1,4-1,5	4,1 %-5,9 %	<1,2 %-<1,3 %	82 %-88 %	2059-2335
PS22F-PhtD*	159-167	2,17	5,8	ND	37 %	ND
PS22F-AHPhtD*	159-167	3,66-4,34	<1 %	ND	28-31 %	ND
PS23F-PD***	914-980	0,5	1,4-1,9 %	3,7 %-4,9 %	137 %-154 %	2933-3152

(continuación)

Conjugados	Tamaño de PS (Da x 10 <sup>3</sup> )	Relación vehículo/PS Ratio	PS Libre (Elisa)	Vehículo libre	Antigenicidad del PS (Elisa)	Tamaño del Conj. (kDa)
* Tamaño de PS después de la microfluidificación del PS nativo *** Polisacárido sin modificación de tamaño ND - no determinado						

5 Se fabricó una vacuna de 10 valencias mezclando conjugados de serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (por ejemplo a una dosis de 1, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1 µg de sacárido, respectivamente por dosis para seres humanos). Se fabricó una vacuna de 11 valencias añadiendo además el conjugado de serotipo 3 de la Tabla 5 (por ejemplo a 1 µg de sacárido por dosis para seres humanos). Se fabricó una vacuna de 13 valencias añadiendo además los conjugados de serotipos 19A y 22F anteriores (con el 22F unido a PhtD directamente, o de manera alternativa mediante un engarce ADH) [por ejemplo, a una dosis de 3 µg de cada sacárido por dosis para seres humanos]. Se puede fabricar una vacuna de 14 valencias añadiendo además el conjugado del serotipo 6A anterior [por ejemplo, a una dosis de 1 µg de sacárido por dosis para seres humanos].

**Ejemplo 3: Pruebas de que la inclusión de proteína D de *Haemophilus influenzae* en una composición inmunogénica de la invención puede proporcionar una mejor protección contra la Otitis media aguda (OMA).**

Diseño del estudio.

15 El estudio utilizaba una vacuna 11Pn-PD – que comprendía los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugados cada uno con proteína D de *H. influenzae* (refiérase a la Tabla 5 en el Ejemplo 4). Los sujetos se dividieron aleatoriamente en dos grupos para recibir cuatro dosis de o bien la vacuna 11Pn-PD o Havrix a aproximadamente los 3, 4, 5 y 12-15 meses de edad. Todos los sujetos recibieron una 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 mezcladas antes de la administración. El seguimiento de la eficacia por el análisis "Según Protocolo" comenzaba a las 2 semanas después de la administración de la tercera dosis de vacuna y continuaba hasta los 24-27 meses de edad. El transporte nasofaríngeo de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* se evaluó en un subgrupo seleccionado de sujetos.

25 Los padres se avisaron para que consultaran con el investigador si su hijo estaba enfermo, tenía dolor de oídos, perforación espontánea de la membrana timpánica o exudado ótico espontáneo. Si el investigador sospechaba un episodio de OMA, el niño se remitía inmediatamente a un especialista de oídos, nariz y garganta (ENT) para la confirmación del diagnóstico.

30 El diagnóstico clínico de OMA se basaba en o bien la apariencia visual de la membrana timpánica (es decir, enrojecimiento, pérdida de reflejo de la luz) o la presencia de derrame de fluido de oído medio (como se demuestra por otoscopia simple o neumática o por microscopía). Además, pueden estar presentes al menos dos de los siguientes signos o síntomas: dolor de oídos, exudado ótico, pérdida de audición, fiebre, letargia, irritabilidad, anorexia, vómitos o diarrea.

35 Para los sujetos enfermos con visitas repetidas, se consideraba que había empezado un nuevo episodio de OMA si habían pasado más de 30 días desde el principio del episodio previo. Además, un episodio de OMA se consideraba que era un nuevo episodio bacteriano si la bacteria aislada/serotipo era diferente del aislado previo cualquiera que fuera el intervalo entre los dos episodios consecutivos.

Resultados del análisis

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

Episodios clínicos y definición de casos de OMA

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

45 La Tabla 3 presenta la eficacia protectora de la vacuna 11Pn-PD y ambas vacunas de 7 valencias ensayadas anteriormente en Finlandia (Eskola y col. N Engl J Med 2001; 344: 403 - 409 y Kilpi y col. Clin Infect Dis 2003 37:1155-64) contra cualquier episodio de OMA y la OMA causada por diferentes serotipos neumocócicos, *H. influenzae*, NTHi y *M. catarrhalis*.

Se alcanzó una reducción estadísticamente significativa y clínicamente relevante del 33,6 % de la carga de enfermedad de OMA total con la 11 Pn-PD, independientemente de la etiología (Tabla 3).

La eficacia total contra los episodios de OMA debido a cualquiera de los 11 serotipos neumocócicos contenidos en la vacuna 11 Pn-PD era del 57,6 % (Tabla 3).

5 Otro importante hallazgo en el presente estudio es el 35,6 % de protección proporcionada por la vacuna 11 Pn-PD contra la OMA causada por *H. influenzae* (específicamente el 35,3 % de protección proporcionada por NTHi). Este hallazgo tiene una significación clínica importante, dado el aumento de la importancia de *H. influenzae* como causante principal de OMA en la era de las vacunas de conjugado neumocócico. En línea con la protección proporcionada contra OMA, la vacuna 11 Pn-PD también reduce el transporte nasofaríngeo de *H. influenzae*, tras la dosis de refuerzo en el segundo año de vida. Estos hallazgos son contrarios a las observaciones previas en Finlandia donde, para ambas vacunas de conjugado neumocócico de 7 valencias, se observaba un aumento de los episodios de OMA debido a *H. influenzae*, (Eskola y col. y Kilpi y col.) como prueba de sustitución etiológica.

10 No se pudo establecer una clara correlación entre la protección contra los episodios de OMA debidos a Hi y los niveles de anticuerpos contra el vehículo proteico D, ya que las concentraciones post-primarias de anticuerpos IgG anti-PD en los vacunados con 11Pn-PD, que permanecían libres de episodios de OMA por Hi, eran esencialmente los mismos que los niveles post-primarios de anticuerpos IgG anti-PD medidos en los vacunados con 11 Pn-PD que desarrollaban al menos un episodio de OMA por Hi durante el periodo de seguimiento de la eficacia. Sin embargo, aunque no se podía establecer una correlación entre el impacto biológico de la vacuna y la inmunogenicidad post-primaria de IgG anti-PD, es razonable asumir que el vehículo proteico PD, que está altamente conservado entre las cepas de *H. influenzae*, contribuía en gran manera a la inducción de la protección contra Hi.

15 El efecto de la enfermedad OMA se acompañaba por un efecto en el transporte nasofaríngeo que era de similar magnitud para la vacuna con serotipo neumocócico y *H. influenzae* (Figura 1). Esta reducción del transporte nasofaríngeo de *H. influenzae* en los vacunados con el 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 se podía correlacionar con las respuestas inmunitarias de IgG anti-PD según se medía por ELISA.

20 En un experimento siguiente se utilizó un modelo de Otitis media en chinchillas con agrupamientos de sueros de niños inmunizados con la formulación de 11 valencias de este ejemplo o con la vacuna de 10 valencias del Ejemplo 2 (véase también la Tabla 1 y 2 y los comentarios al pie). Ambos agrupamientos inducen una reducción significativa de animales con Otitis media frente al agrupamiento de suero pre-inmune. No hay diferencia significativa entre los agrupamientos inmunes 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 tipable en este modelo.

25  
30

Tabla 3

Tipo de episodio de OMA N	11 Pn-PD					Prevnar en FinOM (Estola y co)					7v-OMP en FinOM (Klip y ccl)								
	n		Control	%	VE			n	Control	%	VE			n	Control	%	VE		
	11Pn-PD	Control			LL	UL	95% IC				7v-CRM	Control	LL				UL	95% IC	7v-OMP
Cualquier OMA	2455	2452	499	33,6	20,8	44,3	786	794	6	-4	15	805	794	-1	-12	10			
Cualquier OMA con FOM	322	474	32,4	19,0	43,6	1177	1267	7	-5	17	1279	1267	0	-12	10				
Cultivo de neumococos confirmado	92	189	51,5	36,8	62,9	271	414	34	21	45	314	414	25	11	37				
Serotipos neumocócicos vacunales <sup>(*)</sup>	60	141	57,6	41,4	69,3	107	250	57	44	67	110	250	55	44	66				
Otros patógenos bacterianos																			
<i>H. influenzae</i>	44	68	35,6	3,8	57,0	315	287	-11	-34	8	315	287	-9	-32	10				
<i>H. influenzae</i> no tipable (NTHi)	41	63	35,3	1,8	57,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP				
<i>M. catarrhalis</i>	31	34	9,4	-52,5	46,1	379	381	-1	-19	15	444	381	-16	-36	2				

NP = No publicado; N = número de sujetos en la cohorte de eficacia SEP; n = número de episodios  
 \* Serotipos neumocócicos vacunales para 11 Pn-PD = 11 serotipos para Prevnar y 7v-OMP = 7 serotipos  
 FOM= fluido otico medio

**Ejemplo 4:**

**Selección de vehículo proteico para el serotipo 19F**

Ensayo ELISA utilizado

5 El procedimiento de ELISA de inhibición de 22F se basaba esencialmente en un ensayo propuesto en 2001 por Concepcion y Frasch y fue expuesto por Henckaerts y col., 2006, *Clinical and Vaccine Immunology* 13:356-360. En resumen, los polisacáridos neumocócicos purificados se mezclaron con albúmina sérica humana metilada y se adsorbieron en placas de microtitulación de alta unión Nunc Maxisorp™ (Roskilde, DK) durante una noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con un 10 % de suero bovino fetal (FBS) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente con agitado. Las muestras de suero se diluyeron en PBS que contenía un 10 % de FBS, 10 µg/ml de polisacárido de pared celular (SSI) y 2 µg/ml de polisacárido neumocócico del serotipo 22F (ATCC), y se diluyó adicionalmente en las placas de microtitulación con el mismo también. Se trató una referencia interna calibrada contra el suero de referencia 89-SF utilizando las concentraciones de IgG específica del serotipo de 89-SF de la misma manera y se incluyeron en cada placa. Tras el lavado, los anticuerpos unidos se detectaron utilizando un anticuerpo monoclonal IgG anti-humano conjugado con peroxidasa (Stratech Scientific Ltd., Soham, UK) diluido en un 10 % de FBS (en PBS), y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitado. Se desarrolló el color utilizando el kit de sustrato de inmunoensayo de enzima peroxidasa tetrametilbencidina (BioRad, Hercules, CA, US) en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se paró con H2SO4 0,18 M, y se leyó la densidad óptica a 450 nm. Las concentraciones de IgG específicas de serotipo (en µg/ml) en las muestras se calculó referenciando los puntos de densidad óptica con los límites definidos de la curva de referencia interna de suero, que se había modelizado por la ecuación log logística de 4-parámetros calculada con el software SoftMax Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El punto de corte para el ELISA era de 0,05 µg/ml de IgG para todos los serotipos teniendo en cuenta el límite de detección y el límite de cuantificación.

Ensayo de opsonofagocitosis

25 En el congreso de consulta de la OMS de Junio de 2003, se recomendó el uso de un ensayo OPA como se expone en Romero-Steiner y col., *Clin Diagn Lab Immunol* 2003 10 (6): pp 1019-1024. Este protocolo se utilizó para ensayar la actividad OPA de los serotipos en los siguientes ensayos.

**Preparación de conjugados**

30 En los estudios 11 Pn-PD&Di-001 y 11Pn-PD&Di-007, se incluyeron tres formulaciones vacunales de 11 valencias (Tabla 4) en el que se conjugaron 3 µg del polisacárido 19F con toxoide diftérico (19F-DT) en vez de 1 µg de polisacárido conjugado con 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 desvelan en las Tablas 5, 6 y 7, respectivamente.

35 **Las respuestas de anticuerpo anti-neumocócico y actividad de OPA contra el serotipo 19F un mes después de la vacunación primaria con estas formulaciones 19F-DT se muestran en la Tabla 8 y 9 respectivamente.** La tabla 10 muestra las concentraciones de anticuerpo en el ELISA 22F y los porcentajes de los sujetos que alcanzan el umbral de 0,2 µg/ml antes y después de la vacunación de refuerzo con solo polisacárido de 23 valencias.

40 Se demostró que la actividad opsonofagocítica estaba claramente mejorada por los anticuerpos inducidos con estas formulaciones de 19F-DT como se demostraba por las altas tasas de seropositividad (títulos opsonofagocíticos ≥ 1:8) y GMT OPA un mes después de la vacunación primaria (Tabla 9). Un mes tras la vacunación de refuerzo con solo polisacárido de 23 valencias, la actividad opsonofagocítica de anticuerpos 19F se mantenía significativamente mejor en los niños sensibilizados con las formulaciones 19F-DT (Tabla 11).

45 La Tabla 12 presenta los datos de inmunogenicidad después de la dosis de refuerzo de 11Pn-PD en niños previamente sensibilizados con conjugados 19F-DT o 19F-PD en comparación con una 4ª dosis consecutiva de *Prevnar*®. Dados los casos de éxito informados tras la introducción de *Prevnar*® en los EE. UU., la actividad opsonofagocítica mejorada contra el serotipo 19F cuando se conjugaba con el vehículo proteico DT puede ser una ventaja para la vacuna candidata.

La Tabla 13 proporciona los datos de ELISA y OPA para el conjugado 19F-DT con respecto al serotipo de reacción cruzada 19A. Se descubrió que el 19F-DT induce una actividad OPA baja pero significativa contra 19A.

**Tabla 4 Formulaciones vacunales de conjugados neumocócicas utilizadas en estudios clínicos**

Formulación	µg de serotipo neumocócico/vehículo proteico											Al <sup>3+</sup> mg
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F	
11 Pn-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 Form 1	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	10/DT	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	5/DT	≤ 0,35
19F-DT Form 2	3/PD	2/PD	2/PD	3/PD	5/DT	3/PD	2/PD	2/PD	2/PD	3/DT	5/DT	≤ 0,35



(continuación)

Formulación	µg de serotipo neumocócico/vehículo proteico											Al <sup>3+</sup> mg	
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F		
19F-DT Form 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 conjugados de PS de *S. pneumoniae*-Proteína D/TT/DT**

Serotipo	1 Nativo	3 µfluid	4 Nativo	5 Nativo	6B Nativo	7F Nativo
Conc. PS (mg/ml)	1,5	2	2,0	7,5	5,5	3,0
Disolución PS	NaCl 150 mM	NaCl 2 M	API	API	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Conc. 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. CDAP (mg/mg PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>a</sub>	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 Nativo	14 Nativo	18C Nativo	19F Nativo	23F Nativo
Conc. PS (mg/ml)	1,75	2,5	1,75	4,0	2,5
Disolución PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	API	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Conc. 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. CDAP (mg/mg PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>a</sub>	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 conjugados de PS de *S. pneumoniae*-Proteína D/DT para el estudio de 11 Pn-PD&Di-001**

Serotipo	1 µfluid	3 µfluid	4 µfluid	5 µfluid	6B µfluid	7F Nativo
Conc. PS (mg/ml)	4	2,0	2,5	7,5	10	3,0
Disolución PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Conc. PD (mg/ml)	10,0	5,0	5,0	5,0 NaCl 2 M	20 (DT) NaCl 2 M	5,0
Relación inicial PD/PS (p/p)	1,2/1	1/1	1/1	1/1	1,5/1	1/1
Conc. CDAP (mg/mg PS)	1,50	0,75	1,5	2	1,5	0,75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>a</sub>	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 µfluid	19F µfluid	23F µfluid	
Conc. PS (mg/ml)	1,75	2,5	5,0	9,0	10	
Disolución PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	
Conc. vehículo proteico (mg/ml)	5,0	5,0	5,0	20 (DT)	10 (DT)	
Relación inicial vehículo proteico/PS (p/p)	0,75/1	0,75/1	1,2/1	1,5/1	1,5/1	
Conc. CDAP (mg/mg PS)	0,75	0,75	1,5	1,5	0,75	
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>a</sub>	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 conjugados de PS de *S. pneumoniae*-Proteína D/DT para el estudio 11 Pn-PD&Di-007**

Serotipo	1 Nativo	3 µfluid	4 Nativo	5 Nativo	6B Nativo	7F µfluid
Conc. PS (mg/ml)	1,5	2,0	2	7,5	5,5	5,0
Disolución PS	NaCl 150 mM	NaCl 2 M	API	API	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Conc. 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

(continuación)

Serotipo	1 Nativo	3 µfluid	4 Nativo	5 Nativo	6B Nativo	7F µfluid
Conc. CDAP (mg/mg PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>a</sub>	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 µfluid	14 µfluid	18C Nativo	19F µfluid	19F µfluid	23F µfluid
Conc. PS (mg/ml)	5,0	5,0	1,75	9,0	10,0	9,5
Disolución PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	API	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Conc. vehículo proteico (mg/ml)	10	10,0	5,0	20 (DT)	5,0 (PD)	10
Relación inicial vehículo	1,2/1	1,2/1	1,2/1	1,5/1	1,2/1	1/1
Conc. CDAP (mg/mg PS)	0,5	0,75	0,75	1,5	0,75	0,75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>a</sub>	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

5 **Tabla 8. Porcentaje de sujetos con una concentración de anticuerpos contra 19F ≥ 0,20 µg/ml y la media geométrica de concentraciones de anticuerpo contra 19F (GMC con un 95 % de IC; µg/ml) un mes después de la vacunación primaria con 1 µg de 19F-PD, 3 µg 19F-DT o Prevnar (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 % IC)	GMC (µg/ml) (95 % IC)	N	% ≥ 0,20 µg/ml (95 % IC)	GMC (µg/ml) (95 % IC)
11Pn-PD	152	<b>98,7</b> (95,3-99,8)	<b>1,93</b> (1,67-2,22)	50	<b>100</b> (92,9-100)	<b>2,78</b> (2,31-3,36)
19F-DT Form 1 <sup>†</sup>	146	<b>99,3</b> (96,2-100)	<b>2,88</b> (2,45-3,38)	-	-	-
19F-DT Form 2 <sup>†</sup>	150	<b>96,0</b> (91,5-98,5)	<b>2,43</b> (2,01-2,94)	-	-	-
19F-DT Form 3 <sup>†</sup>	-	-	-	50	<b>96,0</b> (86,3-99,5)	<b>3,70</b> (2,58-5,30)
<i>Prevnar</i>	148	<b>98,6</b> (95,2-99,8)	<b>2,98</b> (2,60-3,41)	41	<b>97,6</b> (87,1-99,9)	<b>2,91</b> (2,15-3,94)

<sup>†</sup> La composición de diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

**Tabla 9. Porcentaje de sujetos con un título OPA de 19F  $\geq$  1:8 y GMT de OPA de 19F un mes después de la vacunación primaria con 1  $\mu$ g de 19F-DT o Pevnar (2  $\mu$ g de 19F-CRM) (Cohorte total)**

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

<sup>†</sup> La composición de diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

5 **Tabla 10. Porcentaje de sujetos con una concentración de anticuerpos contra 19F  $\geq$  0,20  $\mu$ g/ml y GMC de anticuerpos contra 19F ( $\mu$ g/ml) antes y un mes después del refuerzo con solo polisacárido de 23 valencias en niños sensibilizados con 1  $\mu$ g de 19F-PD, 3  $\mu$ g de 19F-DT o Pevnar (2  $\mu$ g-CRM) (Cohorte total)**

Grupo primario	11Pn-PD&Di-002 (22F ELISA)					
	Antes de la vacunación de refuerzo			Un mes tras el refuerzo con PS de 23 valencias		
	N	% $\geq$ 0,20 mg/ml (95 % IC)	GMC (mg/ml) (95 % IC)	N	% $\geq$ 0,20 mg/ml (95 % IC)	GMC (mg/ml) (95 % IC)
11 Pn-PD	70	<b>77,1</b> (65,6-86,3)	<b>0,67</b> (0,45-0,98)	67	<b>94,0</b> (85,4-98,3)	<b>11,50</b> (7,76-17,03)
19F-DT Form 1 <sup>†</sup>	68	<b>91,2</b> (81,8-96,7)	<b>0,71</b> (0,54-0,94)	69	<b>98,6</b> (92,2-100)	<b>14,50</b> (10,47-20,07)
19F-DT Form 2 <sup>†</sup>	74	<b>81,1</b> (70,3-89,3)	<b>0,59</b> (0,43-0,80)	72	<b>95,8</b> (88,3-99,1)	<b>9,90</b> (6,74-14,54)
<i>Pevnar</i>	65	<b>64,6</b> (51,8-76,1)	<b>0,40</b> (0,27-0,60)	67	<b>100</b> (94,6-100)	<b>9,40</b> (6,95-12,71)

<sup>†</sup> La composición de diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

10 **Tabla 11. Porcentaje de sujetos con un título OPA de 19F  $\geq$  1:8 y GMT de OPA de 19F antes y un mes después del refuerzo con polisacáridos solos de 23 valencias en niños sensibilizados con 1  $\mu$ g de 19F-PD, 3  $\mu$ g de 19F-DT o Pevnar (2  $\mu$ g 19F-CRM) (Cohorte total)**

Grupo primario	11Pn-PD&Di-002					
	Antes de la vacunación de refuerzo			Un mes tras el refuerzo con PS de 23 valencias		
	N	$\geq$ 1:8 (95 % IC)	GMT (95 % IC)	N	% $\geq$ 1:8 (95 % IC)	GMT (95 % IC)
11 Pn-PD	29	<b>27,6</b> (12,7-47,2)	<b>10,9</b> (5,0-23,7)	28	<b>82,1</b> (63,1-93,9)	<b>408,0</b> (157,3-1058,3)
19F-DT Form 1 <sup>†</sup>	19	<b>47,4</b> (24,4-71,1)	<b>18,1</b> (7,2-45,7)	18	<b>94,4</b> (72,7-99,9)	<b>1063,8</b> (386,6-2927,5)

(continuación)

Grupo primario	11Pn-PD&Di-002					
	Antes de la vacunación de refuerzo			Un mes tras el refuerzo con PS de 23 valencias		
	N	≥ 1:8 (95 % IC)	GMC (95 % IC)	N	% ≥ 1:8 (95 % IC)	GMC (95 % IC)
19F-DT Form 2 <sup>†</sup>	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)

<sup>†</sup> La composición de diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

5

**Tabla 12. Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpos ≥ 0,2 µg/ml, OPA ≥ 1:8 y GMC/GMT contra 19F de neumococos un mes después del refuerzo con 11 Pn-PD o Pevnar en niños sensibilizados con 1 µg de 19F-PD, 3 µg de 19F-DT o Pevnar (2 µg de 19F-CRM) (Cohorte total)**

Grupo primario	11Pn-PD&Di-002					
	Ensayo 22F-ELISA			Ensayo OPA		
	N	% ≥ 0,20 mg/ml (95 % IC)	GMC (mg/ml) (95 % IC)	N	% ≥ 1:8 (95 % IC)	GMC (95 % IC)
11 Pn-PD	70	100 (94,9-100)	4,52 (3,7-5,5)	21	100 (83,9-100)	255,6 (135,5-481,9)
19F-DT Form 1 <sup>†</sup>	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)
19F-DT Form 2 <sup>†</sup>	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>Pevnar</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)

<sup>†</sup> La composición de diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

**Tabla 13. Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpos ≥ 0,2 µg/ml, OPA ≥ 1:8 y GMC/GMT contra 19A de neumococos un mes después de la vacunación primaria con 1 µg de 19F-PD, 3 µg 19F-DT o Pevnar (2 µg 19F-CRM) (Cohorte total)**

Grupo	11Pn-PD&Di-001					
	Ensayo 22F-ELISA			Ensayo OPA		
	N	% ≥ 0,20 mg/ml (95 % IC)	GMC (mg/ml) (95 % IC)	N	% ≥ 1:8 (95 % IC)	GMC (95 % IC)
11 Pn-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)
19F-DT Form 2 <sup>†</sup>	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>Pevnar</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)

<sup>†</sup> La composición de diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

10

**Ejemplo 5: Experimentos de adyuvantes en modelos preclínicos: impacto de la inmunogenicidad de conjugados de polisacárido de 11 valencias en monos Rhesus ancianos.**

Para optimizar la respuesta que se desarrolla contra las vacunas neumocócicas conjugadas en la población anciana, GSK formuló una vacuna de polisacárido (PS) conjugado con un nuevo Adyuvante, el adyuvante C – véase posteriormente.

15

## ES 2 626 662 T3

Se inmunizaron por vía intramuscular (IM) grupos de 5 monos Rhesus ancianos (14 a 28 años de edad) los días 0 y 28 con 500 µl de conjugados de PS de 11 valencias adsorbidos en 315 µg de AIPO4 o conjugados de PS mezclados con adyuvante C.

5 En ambas formulaciones vacunales, los conjugados de PS de 11 valencias se componían 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 utilizada era 1/5 de la dosis humana de la vacuna (5 µg de cada sacárido por dosis humana excepto para 6B [10 µg] conjugados de acuerdo con las condiciones de la Tabla 6 (Ejemplo 4), excepto 19F que se hizo de acuerdo con las condiciones del procedimiento CDAP siguientes: el sacárido modificado de tamaño a 9 mg/ml, la PD a 5 mg/ml, una relación inicial PD/PS de 1,2/1, una concentración de CDAP de 0,75 mg/mg de PS, 10 pH<sub>a</sub>=pH<sub>b</sub>=pH<sub>c</sub> 9,0/9,0/9,0 y un tiempo de acoplamiento de 60 min.

Los niveles de IgG anti-PS por ELISA y los títulos de opsono-fagocitosis se cuantificaron en los sueros recolectados el día 42. Se midieron las frecuencias de los linfocitos B de memoria anti-PS3 por Elispot a partir de las células sanguíneas periféricas recolectadas el día 42.

15 De acuerdo con los resultados que se muestran en el presente documento posteriormente, el Adyuvante C mejora significativamente la inmunogenicidad de los conjugados de PS de 11 valencias frente a los conjugados con AIPO4 en monos ancianos. El nuevo adyuvante aumenta las respuestas de IgG a los PS (Figura 1) y los títulos de opsonofagocitosis de los anticuerpos (Tabla 14). También había una evidencia que apoya el aumento de frecuencia de linfocitos B específicos de PS3 con el uso de Adyuvante C (Figura 2).

Tabla 14. Inmunoogenicidad del conjugado en monos Rhesus anciano (titulos de opsono-fagocitosis post-II)

	PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7F	PS9V	PS14	PS18C	PS19F	PS23F
11-valencias A/PPO4	<8	5	<8	5	<8	16	<8	<8	<8	<8	<8
Pre-immune											
Dia 14 post II	8	181	64	49	64	4096	42	37	169	64	<64
11 valencias Ady-C	5	9	<8	5	8	37	<8	<8	<8	<8	<8
Pre-immune											
Dia 14 post II	776	1351	891	676	6208	16384	111	161	7132	2048	<64

**Elispot de Linfocitos B**

5 El principio del ensayo reposa en el hecho de que los linfocitos B de memoria maduran en células plasmáticas in vitro tras el cultivo con CpG durante 5 días. Las células plasmáticas específicas de antígeno generadas in vitro se pueden detectar fácilmente y por lo tanto se pueden enumerar utilizando el ensayo elispot de linfocitos B. El número de células plasmáticas específicas refleja la frecuencia de linfocitos B de memoria al inicio 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 antígeno/anticuerpo, que se detectan por un procedimiento inmuno-enzimático convencional y se enumeran como linfocitos B de memoria.

10 En el presente estudio, se utilizaron polisacáridos para revestir las placas de cultivo con el fin de enumerar los respectivos linfocitos B de memoria. Los resultados se expresan como la frecuencia de linfocitos B de memoria específicos de PS en un millón de linfocitos B.

15 El estudio muestra que el Adyuvante C puede ser capaz de reducir el problema conocido de reforzabilidad de PS3 (véase, 5<sup>o</sup> International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, 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. Eficacia de la neumolisina detoxificada (dPly) como vehículo proteico para aumentar la inmunogenicidad de PS 19F en ratones Balb/c jóvenes**

Se inmunizaron por vía IM grupos de 40 ratones Balb/c hembras (4 semanas de edad) los días 0, 14 y 28 con 50 µl de PS solo de 4 valencias o PS conjugado con dPly de 4 valencias, ambas mezcladas con Adyuvante C.

20 Ambas formulaciones vacunales 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 anti-PS por ELISA se dosificaron en sueros recolectados el día 42.

25 La respuesta anti-PS19F, que se muestra como un ejemplo en la Figura 3, estaba fuertemente aumentada en ratones a los que se administraba conjugados con dPly en comparación con los ratones inmunizados con PS solo. La misma mejoría se observó las respuestas de IgG para anti-PS8, 12F y 22F (datos no mostrados).

**Ejemplo 7. Eficacia de la proteína D de la tríada de histidina neumocócica (PhtD) como vehículo proteico para aumentar la inmunogenicidad del PS 22F en ratones Balb/c jóvenes**

Se inmunizaron por vía IM grupos de 40 ratones Balb/c hembras (4 semanas de edad) los días 0, 14 y 28 con 50 µl de PS solo de 4 valencias o PS conjugado con PhtD de 4 valencias, ambos mezclados con Adyuvante C.

30 Ambas formulaciones vacunales 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 anti-PS por ELISA se cuantificaron en los sueros recolectados el día 42.

35 La respuesta anti-PS22F, que se muestra como un ejemplo en la Figura 4, estaba aumentada fuertemente en los ratones a los que se administró los conjugados con PhtD de 4 valencias en comparación con los ratones inmunizados con PS solo. La misma mejoría se observaba en las respuestas de IgG anti-PS8, 12F y 19F (datos no mostrados).

**Ejemplo 8. Inmunogenicidad en ratones C57Bl ancianos de los conjugados de PS de 13 valencias que contenían 19A-dPly y 22F-PhtD**

40 Se inmunizaron por vía IM grupos de 30 ratones C57Bl ancianos (>69 semanas) los días 0, 14 y 28 con 50 µl de conjugados de PS de 11 valencias o conjugados de PS de 13 valencias, ambos mezclados con Adyuvante C (véase posteriormente).

45 La formulación vacunal de 11 valencias estaba compuesta por 0,1 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna de 11 valencias expuesto bajo la Tabla 2). La formulación vacunal de 13 valencias contenía además 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre vacunas de 13 valencias expuesto bajo la Tabla 2 [utilizando el 22F conjugado directamente]). En el grupo 2 y 4 el vehículo neumolisina se detoxicó con tratamiento con GMBS, en el grupo 3 y 5 se hizo con formaldehído (procedimientos descritos en el documento WO 04/81515). En los grupos 2 y 3 se utilizó PhtD para conjugar el PS 22F, en los Grupos 4 y 5 se utilizó una fusión de PhtD\_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6 se conjugó el 19A con toxoide diftérico y el 22F con proteína D.



Se evaluaron los niveles de IgG anti-PS19A y 22F en sueros individuales recolectados el día 42 utilizando el siguiente procedimiento. La respuesta de IgG por ELISA generada contra los otros PS se midió en sueros agrupados.

Procedimientos de serología en ratón

5 Se evaluaron los niveles de IgG anti-PS19A por ELISA en sueros recolectados el día 42 utilizando el procedimiento descrito en el presente documento a continuación:

Se revistieron microplacas durante 2 horas a 37 °C con PS neumocócico purificado tipo 19A (10 µg/ml) en tampón PBS. Las placas se lavaron cuatro veces con NaCl al 0,9 % mM-Tween 20 un 0,05 %. Los sueros se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 50 µg/ml de CPS (v/v) en PBS con un 0,05 % de Tween 20. Se añadieron los sueros en los micropocillos y se diluyeron en serie (etapa de dilución de 2 veces) en PBS-BSA al 0,05 %, Tween al 0,05 %. Se incubaron las placas con agitado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como anteriormente y se añadió un conjugado de anti-IgG de ratón-peroxidasa (diluido 1/2500) y se incubaron las placas durante 30 minutos a TA. Tras el lavado, se añadió el sustrato (4 mg de OPDA en 10 ml de citrato 0,1 M pH 4,5 y 5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a cada pocillo durante 15 minutos. La reacción se paró por la adición de HCl 1 N. Se leyó la absorbancia a 490-620 nm utilizando un espectrofotómetro. El color que se desarrolla es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero.

El nivel de IgG anti-PS19A presente en las muestras de suero se determinó por comparación con la curva de referencia y se expresó en µg/ml. Se generó una curva de referencia para cada placa a partir de los resultados del ELISA para cantidades conocidas de suero añadido.

20 Se evaluaron los niveles de IgG anti-PS22F por ELISA en los sueros recolectados el día 42 utilizando el procedimiento descrito en el presente documento a continuación:

Se revistieron microplacas durante 2 horas a 37 °C con PS neumocócico purificado tipo 22F (10 µg/ml) en tampón PBS. Las placas se lavaron cuatro veces con NaCl al 0,9 % mM-Tween 20 un 0,05 %. Los sueros se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 50 µg/ml de CPS (v/v) en PBS con un 0,05 % de Tween 20. Se añadieron los sueros en los micropocillos y se diluyeron en serie (etapa de dilución de 2 veces) en PBS-BSA al 0,05 %, Tween al 0,05 %. Se incubaron las placas con agitado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como anteriormente y se añadió un conjugado de anti-IgG de ratón- peroxidasa (diluido 1/2500) y se incubaron las placas durante 30 minutos a TA. Tras el lavado, se añadió el sustrato (4 mg de OPDA en 10 ml de citrato 0,1 M pH 4,5 y 5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a cada pocillo durante 15 minutos. La reacción se paró por la adición de HCl 1 N. Se leyó la absorbancia a 490-620 nm utilizando un espectrofotómetro. El color que se desarrolla es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero.

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

35 Las respuestas inmunitarias dirigidas contra los otros serotipos se realizaron de acuerdo con los mismos procedimientos excepto que el suero de los ratones se agrupó.

19A-dPly y 22F-PhtD administrados en la formulación vacunal de conjugados de 13 valencias demostraron inmunogenicidad en ratones C57Bl ancianos (Tabla 15). La respuesta inmunitaria inducida contra los otros PS no estaba afectada negativamente en los ratones a los que se administró la formulación de 13 valencias en comparación con los inmunizados con la formulación de 11 valencias.

40 **Tabla 15. Inmunogenicidad de PS en ratones C57Bl ancianos (niveles de IgG post-III)**

Ratones negros C57 ancianos						
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmb 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmb 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-DT 22F-PD 0,1 µg/50 µl Ady C
<b>1</b>	<b>Promedio del agrupamiento</b>	<b>19,30</b>	<b>20,20</b>	<b>24,40</b>	<b>12,80</b>	<b>12,10</b>
<b>3</b>	<b>Promedio del agrupamiento</b>	<b>6,32</b>	<b>4,84</b>	<b>5,21</b>	<b>6,74</b>	<b>2,38</b>

(continuación)

Ratones negros C57 ancianos							
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	
	11V 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-DT 22F-PD 0,1 µg/50 µl Ady C	
4	Promedio del agrupamiento	60,9	67,1	51,4	47,4	45,5	41,1
5	Promedio del agrupamiento	1,34	3,81	3,06	2,75	1,26	1,23
6B	Promedio del agrupamiento	4,41	4,12	5,88	1,58	2,31	5,64
7F	Promedio del agrupamiento	0,83	0,81	1,65	1,98	0,89	0,99
9V	Promedio del agrupamiento	13,8	23,7	20,0	13,1	15,5	9,6
14	Promedio del agrupamiento	25,73	42,96	34,12	32,53	23,97	15,60
18C	Promedio del agrupamiento	13,4	20,1	11,9	9,1	8,3	8,4
19F	Promedio del agrupamiento	57,5	90,0	63,8	36,5	47,0	69,1
23F	Promedio del agrupamiento	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19A	GMC IC %sero+	0,06 0,04-0,1 33 %	0,09 0,05-0,14 47 %	0,25 0,15-0,41 83 %	0,08 0,06-0,12 53 %	0,23 0,14-0,38 80 %	0,19 0,09-0,3 73 %
22F	GMC IC %sero+	NR 0 %	5,81 3,2-10,6 97 %	3,76 1,8-7,9 90 %	0,54 0,3-1,1 77 %	0,85 0,4-1,7 87 %	2,02 1,2-3,4 97 %
NR –resultados experimentales no determinados							

Procedimiento OPA en ratón

- 5 Las muestras de suero se calentaron durante 45 min a 56 °C para inactivar cualquier complemento endógeno. Se diluyeron en serie 2 veces alícuotas de veinticinco microlitros de suero diluido 1:2 en 25 µl de tampón OPA (HBSS-un 14,4 % de FBS inactivado) por pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo. Posteriormente, se añadieron 25 µl de una mezcla de células HL-60 activadas (1 x 10<sup>7</sup> células/ml), siembra neumocócica de trabajo recién descongelada y complemento de gazapo recién descongelada en una relación, por ejemplo, de 4/2/1 (v/v/v) al suero diluido para dar lugar un volumen final de 50 µl. La placa de ensayo se incubó durante 2 h a 37 °C con agitado orbital (210 rpm) para promover el proceso fagocítico. La reacción se paró dejando la microplaca en hielo durante al menos 1 min. Se transfirió entonces una alícuota de 20 µl de cada pocillo de la placa en el pocillo correspondiente de una microplaca de 96 pocillos de fondo plano y se añadieron 50 µl de caldo Todd-Hewitt- un 0,9 % de agar a cada pocillo. Tras una noche de incubación a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>, las colonias neumocócicas que aparecían en el agar se contaron utilizando un sistema de análisis de imágenes automático (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se utilizaron ocho pocillos sin muestra de suero como controles bacterianos para determinar el número de neumococos por pocillo. El número medio de UFC de los pocillos de control se
- 10
- 15

determinó y se utilizó para el cálculo de la actividad de destrucción de cada muestra de suero. El título OPA de las muestras de suero se determinó por dilución recíproca de suero capaz de facilitar el 50 % de destrucción de neumococos. El título opsonofagocítico se calculó utilizando un análisis de ajuste a la curva de 4 parámetros.

Los resultados de los ensayos de opsono-fagocitosis se muestran en las Figuras 13 y 14.

**5 Ejemplo 9. Inmunogenicidad de conjugados de PS de 13 valencias que contienen 19A-dPly y 22F-PhtD en ratones Balb/c jóvenes**

Se inmunizaron por vía IM grupos de 30 ratones Balb/c (4 semanas de edad) los días 0, 14 y 28 con 50 µl de conjugados de PS de 11 valencias o conjugados de PS de 13 valencias, ambos mezclados con Adyuvante C (Véase posteriormente).

10 La formulación vacunal de 11 valencias estaba compuesta por 0,1 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna de 11 valencias expuesto bajo la Tabla 2). La formulación vacunal de 13 valencias contenía además 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly y PS 22F-PhtD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna de 13 valencias expuesta bajo la Tabla 2 [utilizando 22F conjugado directamente]). En el grupo 2 y 4 el vehículo de neumolisina estaba detoxicada por tratamiento con GMBS, en el grupo 3 y 5 se hizo con formaldehído (procedimientos descritos en el documento WO 04/81515). En los grupos 2 y 3 se utilizó PhtD para conjugar el PS 22F, en los Grupos 4 y 5 se utilizó una fusión de PhtD\_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6 se conjugó el 19A con toxoide diftérico y el 22F con proteína D.

20 Los niveles de IgG anti-PS19A y 22F por ELISA se cuantificaron en los sueros recolectados el día 42. La respuesta de IgG por ELISA generada contra los otros PS se midió en sueros agrupados.

El 19A-dPly y 22F-PhtD administrados en la formulación vacunal de conjugados de 13 valencias demostraron ser inmunogénicos en ratones Balb/c jóvenes (Tabla 16). La respuesta inmunitaria inducida contra otros PS no tenía un impacto negativo en los ratones a los que se administraba la formulación de 13 valencias en comparación con los inmunizados con la formulación de 11 valencias.

25 Los ELISA se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 8.

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

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

(continuación)

Ratones BalbC							
ELISA	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	
	11V 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Ady C	11V 19A-DT 22F-PD 0,1 µg/50 µl Ady C	
18C	Promedio del agrupamiento	53,4	52,37	46,5	57,8	47,8	75,8
19F	Promedio del agrupamiento	186,6	157,7	169,3	178,9	181,9	223,2
23F	Promedio del agrupamiento	4,98	3,9	5,11	0,57	3,13	4,57
19A	GMC IC %sero+	0,4 0,2-0,6 93 %	32,8 26,4-40,7 100 %	25,1 20,6-30,6 100 %	21,6 17,5-26,7 100 %	18,9 15,1-23,5 100 %	23,5 19,5-28,5 100 %
22F	GMC IC %sero+	NR 0 %	3,99 1,9-8,42 93 %	3,76 1,8-8 100 %	6,27 3,8-10,4 100 %	8,70 5,4-13,9 100 %	18,76 15,2-23,1 100 %
NR –resultados experimentales no determinados							

Procedimiento OPA en el ratón

- 5 Las muestras de suero se calentaron durante 45 min a 56 °C para inactivar cualquier complemento endógeno. Se diluyeron en serie 2 veces alícuotas de veinticinco microlitros de suero diluido 1:2 en 25 µl de tampón OPA (HBSS-un 14,4 % de FBS inactivado) por pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo. Posteriormente, se añadieron 25 ml de una mezcla de células HL-60 activadas (1 x 10<sup>7</sup> células/ml), siembra neumocócica de trabajo recién descongelada y complemento de gazapo recién descongelada en una relación, por ejemplo, de 4/2/1 (v/v/v) al suero diluido para dar lugar un volumen final de 50 µl. La placa de ensayo se incubó durante 2 h a 37 °C con agitado orbital (210 rpm) para promover el proceso fagocítico. La reacción se paró dejando la microplaca en hielo durante al menos 1 min. Se transfirió entonces una alícuota de 20 µl de cada pocillo de la placa en el pocillo correspondiente de una microplaca de 96 pocillos de fondo plano y se añadieron 50 µl de caldo Todd-Hewitt- un 0,9 % de agar a cada pocillo. Tras una noche de incubación a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>, las colonias que aparecían neumocócicas en el agar se contaron utilizando un sistema de análisis de imagen automático (KS 400, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se utilizaron ocho pocillos sin muestra de suero como controles bacterianos para determinar el número de neumococos por pocillo. El número medio de UFC de los pocillos de control se determinó y se utilizó para el cálculo de la actividad de destrucción de cada muestra de suero. El título OPA de las muestras de suero se determinó por dilución recíproca de suero capaz de facilitar el 50 % de destrucción de neumococos. El título opsonofagocítico se calculó utilizando un análisis de ajuste a la curva de 4 parámetros.
- 10
- 15
- 20 Los resultados se muestran en las Figuras 15 y 16.

Resultados de formulaciones en aluminio:**Inmunogenicidad en ratones Balb/c jóvenes de los conjugados de PS de 13 valencias que contienen 19A-Ply y 22F-PhtD**

- 25 Se inmunizaron por vía IM grupos 40 ratones Balb/c jóvenes (4 semanas de edad) los días 0, 14 y 28 con 50 µl de conjugados de PS de 11 valencias o conjugados de PS de 13 valencias, ambos adsorbidos en AIPO4. Se co-administró Infanrix Hexa.

- 30 La formulación vacunal de 11 valencias estaba compuesta por 0,1 µg de sacárido en cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna de 11 valencias expuesto bajo la Tabla 2). La formulación vacunal de 13 valencias contenía además 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna de 13 valencias expuesto bajo la Tabla 2 [utilizando el 22F conjugado directamente]). En los grupos 2 y 4 el vehículo neumolisina se detoxicó por tratamiento con GMBS, en los grupos 3 y

5 se hizo con formaldehído. En los grupos 2 y 3 se utilizó PhtD para conjugarse con el PS 22F, en los Grupos 4 y 5 se utilizó una fusión de PhtD\_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6, se conjugó el 19A con toxoide diftérico y el 22F con proteína D.

5 Los niveles de IgG anti-PS19A y 22F por ELISA y los títulos de opsono-fagocitosis se cuantificaron en los sueros individuales recolectados el día 42. La respuesta de IgG por ELISA generada contra los otros PS se cuantificó en sueros agrupados.

10 Los conjugados 19A-dPly y 22F-PhtD administrados en la formulación vacunal de conjugados de 13 valencias demostraron ser inmunogénicos y que inducían títulos opsonofagocíticos en ratones Balb/c jóvenes (Tabla 17 y Figuras 19-20). La respuesta inmunitaria inducida contra los otros PS no tenía un impacto negativo en los ratones a los que se administraba la formulación de 13 valencias en comparación con los inmunizados con la formulación de 11 valencias.

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

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

ELISA POST III		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
		11V 1/10 HD SC	11V 19A-Ply GMBS 22F-PhtD 1/10 HD SC	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 1/10 HD SC	11V 19A-dPly GMBS 22F-PhtDE 1/10 HD SC	11V 19A-dPly formol 22F-PhtDE 1/10 HD SC	11V 19A-DT 22F-PD 1/10 HD SC
1	Promedio del agrupamiento	37,535	35,312	56,839	39,781	35,739	30,270
3	Promedio del agrupamiento	9,093	9,874	7,991	10,548	7,502	8,217
4	Promedio del agrupamiento	28,422	27,439	25,796	31,274	34,295	31,589
5	Promedio del agrupamiento	9,256	8,668	9,6	7,551	8,869	8,309
6B	Promedio del agrupamiento	0,552	0,423	0,565	0,264	0,263	0,435
7F	Promedio del agrupamiento	3,771	2,541	5,394	2,618	2,754	3,048
9V	Promedio del agrupamiento	23,447	23,479	27,394	19,072	24,282	28,017
14	Promedio del agrupamiento	25,921	26,103	24,927	16,487	20,517	24,795
18C	Promedio del agrupamiento	6,223	6,873	7,726	5,812	9,186	9,146
19F	Promedio del agrupamiento	61,271	70,498	88,336	73,879	96,521	66,484
23F	Promedio del agrupamiento	1,836	0,669	0,648	0,259	1,116	0,596
19A	GMC 95 % IC %sero+	0,065 NT 65 %	1,797 1,206-2,678 100 %	2,256 1,71-2,977 100 %	1,950 1,368-2,778 100 %	2,128 1,478-3,064 100 %	3,640 2,793-4,744 100 %
22F	GMC 95 % IC %sero+	0,05 0,05-0,05 0 %	0,171 0,104-0,282 53 %	0,097 0,0690,141 41 %	9,924 7,19-13,695 100 %	8,837 5,692-13,719 100 %	11,993 9,079-15,842 100 %

15 **Inmunogenicidad en ratones OF1 jóvenes de conjugados de PS de 13 valencias que contienen 19A-Ply y 22F-PhtD**

Se inmunizaron por vía IM ratones OF1 jóvenes (4 semanas de edad) los días 0, 14 y 28 con 50 µl de conjugados PS de 11 valencias o conjugados de PS de 13 valencias, ambos adsorbidos en AlPO4. Se co-administró con Infanrix

Hexa.

La formulación vacunal de 11 valencias estaba compuesta por 0,1 µg de sacárido en cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna de 11 valencias expuesto bajo la Tabla 2). La formulación vacunal de 13 valencias contenía además 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna de 13 valencias expuesto bajo la Tabla 2 [utilizando el 22F conjugado directamente]). En los grupos 2 y 4 el vehículo neumolisina se detoxicó por tratamiento con GMBS, en los grupos 3 y 5 se hizo con formaldehído. En los grupos 2 y 3 se utilizó PhtD para conjugarse con el PS 22F, en los Grupos 4 y 5 se utilizó una fusión de PhtD\_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6, se conjugó el 19A con toxoide diftérico y el 22F con proteína D.

Los niveles de IgG anti-PS19A y 22F por ELISA y los títulos de opsono-fagocitosis se cuantificaron en los sueros individuales recolectados el día 42. La respuesta de IgG por ELISA generada contra los otros PS se cuantificó en sueros agrupados.

Los conjugados 19A-dPly y 22F-PhtD administrados en la formulación vacunal de conjugados de 13 valencias demostraron ser inmunogénicos y que inducían títulos opsonofagocíticos en ratones OF1 jóvenes (Tabla 18 y Figuras 21-22). La respuesta inmunitaria inducida contra los otros PS no tenía un impacto negativo en los ratones a los que se administraba la formulación de 13 valencias en comparación con los inmunizados con la formulación de 11 valencias.

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

**Tabla 18. Inmunogenicidad en ratones OF1 jóvenes (niveles de IgG post-III)**

ELISA POST III	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V 1/10 HD SC	11V 19A-Ply GMBS 22F-PhtD 1/10 HD SC	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 1/10 HD SC	11V 19A-dPly GMBS 22F- PhtDE 1/10 HD SC	11V 19A-dPly formol 22F-PhtDE 1/10 HD SC	11V 19A-DT 22F-PD 1/10 HD SC
1 Promedio del agrupamiento	39,668	50,854	40,384	30,108	34,753	34,487
3 Promedio del agrupamiento	5,562	6,266	7,243	4,665	5,510	5,188
4 Promedio del agrupamiento	21,979	30,567	27,65	26,646	23,159	23,296
5 Promedio del agrupamiento	8,884	7,986	9,495	9,303	11,318	8,984
6B Promedio del agrupamiento	3,158	4,139	3,48	2,44	3,784	3,137
7F Promedio del agrupamiento	7,134	8,843	12,471	6,497	7,607	6,607
9V Promedio del agrupamiento	24,052	37,153	36,348	35,168	29,746	26,592
14 Promedio del agrupamiento	29,027	46,057	36,605	40,883	35,026	39,186
18C Promedio del agrupamiento	4,961	6,508	4,587	5,148	6,783	4,915
19F Promedio del agrupamiento	48,667	74,366	45,561	63,845	68,155	47,703
23F Promedio del agrupamiento	0,664	1,093	0,996	0,212	0,764	1,579
19A GMC 95 % CI % sero+	0,057 NT 48 %	1,849 1,132-3,020 100 %	2,266 1,439-3,569 98 %	1,864 1,157-3,004 95 %	3,751 2,825-4,980 100 %	2,434 1,725-3,435 100 %

(continuación)

ELISA POST III	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	11V 1/10 HD SC	11V 19A-Ply GMBS 22F-PhtD 1/10 HD SC	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 1/10 HD SC	11V 19A-dPly GMBS 22F- PhtDE 1/10 HD SC	11V 19A-dPly formol 22F-PhtDE 1/10 HD SC	11V 19A-DT 22F-PD 1/10 HD SC
22F GMC 95 % CI % sero+	0,064 NT 22,5 %	11,190 6,225-20,114 96,9 %	16,196 9,718-26,992 97,5 %	12,431 7,95-19,439 97,5 %	17,319 12,056-24,879 100,0 %	27,490 22,044-34,281 100,0 %

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

- 5 Se inmunizaron por vía IM grupos de 20 cobayas jóvenes (Estirpe Hartley; 5 semanas de edad) los días 0, 14 y 28 con 125 µl de conjugados de PS de 11 valencias o conjugados de PS de 13 valencias, ambos mezclados con Adyuvante C (véase posteriormente).

La formulación vacunal de 11 valencias estaba compuesta por 0,25 µg de sacárido de cada uno de los siguientes conjugados: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT y PS23F-PD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna de 11 valencias expuesto bajo la Tabla 2). La formulación vacunal de 13 valencias contenía además 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y el comentario sobre la vacuna de 13 valencias expuesto bajo la Tabla 2 [utilizando el 22F conjugado directamente]). En los grupos 2 y 4 el vehículo neumolisina se detoxicó por tratamiento con GMBS, en los grupos 3 y 5 se hizo con formaldehído. En los grupos 2 y 3 se utilizó PhtD para conjugarse con el PS 22F, en los Grupos 4 y 5 se utilizó una fusión de PhtD\_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6, se conjugó el 19A con toxoide diftérico y el 22F con proteína D.

Los niveles de IgG anti-PS19A y 22F por ELISA se evaluaron en sueros individuales recolectados el día 42 utilizando el siguiente protocolo. La respuesta de IgG por ELISA generada contra los otros PS se midió en sueros agrupados.

20 Procedimientos de serología en cobayas

Los niveles de IgG anti-PS19A por ELISA se evaluaron en sueros recolectados el día 42 utilizando el procedimiento descrito en el presente documento a continuación:

25 Las microplacas se revistieron durante 2 horas a 37 °C con PS neumocócico tipo 19A purificado (10 µg/ml) en tampón PBS. Las placas se lavaron cuatro veces con NaCl al 0,9 % mM-Tween 20 al 0,05 %. Se incubaron los sueros durante 1 hora a 37 °C con 50 µg/ml de CPS (v/v) en PBS al 0,05 % Tween 20. Los sueros se añadieron en los micropocillos y se diluyeron en serie (etapa de dilución de dos veces) en PBS-BSA al 0,05 % Tween al 0,05 %. Las placas se incubaron con agitado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como anteriormente y se añadió un conjugado de IgG anti-cobaya y peroxidasa (diluida 1/1000) y las placas se incubaron durante 30 minutos a TA. Tras el lavado, se añadió el sustrato (4 mg de OPDA en 10 ml de citrato 0,1 M pH 4,5 y 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a cada pocillo durante 15 minutos. La reacción se paró por la adición de HCl 1 N. Se leyó la absorbancia a 490-620 nm utilizando un espectrofotómetro. El color que se desarrolla es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero.

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

- 35 Los niveles de IgG anti-PS22F por ELISA se cuantificaron en los sueros recolectados el día 42 utilizando el procedimiento descrito en el presente documento a continuación:

40 Las microplacas se revistieron durante 2 horas a 37 °C con PS neumocócico tipo 22F purificado (10 µg/ml) en tampón PBS. Las placas se lavaron cuatro veces con NaCl al 0,9 % mM-Tween 20 al 0,05 %. Se incubaron los sueros durante 1 hora a 37 °C con 50 µg/ml de CPS (v/v) en PBS al 0,05 % Tween 20. Los sueros se añadieron en los micropocillos y se diluyeron en serie (etapa de dilución de dos veces) en PBS-BSA al 0,05 % Tween al 0,05 %. Las placas se incubaron con agitado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como anteriormente y se añadió un conjugado de IgG anti-cobaya y peroxidasa (diluida 1/1000) y las placas se incubaron durante 30 minutos a TA. Tras el lavado, se añadió el sustrato (4 mg de OPDA en 10 ml de citrato 0,1 M pH 4,5 y 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a cada pocillo durante 15 minutos. La reacción se paró por la adición de HCl 1 N. Se leyó la absorbancia a 490-620 nm utilizando un espectrofotómetro. El color que se desarrolla es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero.

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

Las respuestas inmunitarias dirigidas contra los otros serotipos se realizaron de acuerdo con los mismos procedimientos excepto que los sueros de cobaya se agruparon.

5

**Tabla 19. Inmunogenicidad de PS en cobayas (niveles de IgG post-III)**

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

También se utilizaron los ensayos de opsonofagocitosis para ensayar los sueros y los resultados se muestran en las Figuras 17 y 18.

**Ejemplo 11. Formulaciones que se van a fabricar y ensayar**

- 10 a) Se fabricaron las siguientes formulaciones (utilizando la vacuna de 13 valencias de la Tabla 1 y el serotipo 3 de la Tabla 5 – véase el comentario sobre la vacuna de 14 valencias bajo la Tabla 2 [utilizando 22F conjugado directamente o por medio de un engarce de ADH]). Los sacáridos se formulan con fosfato de aluminio y 3D-MPL



como se muestra posteriormente.

<b>14V 25 µg MPL</b> <b>Suma de contenido en aluminio BAC →FF</b> <b>Por Dosis:</b>						<b>14V 25 µg MPL</b> <b>Suma de contenido en aluminio BAC →FF</b> <b>Por Dosis:</b>					
PS	Vehículo	µg PS	µg MPL	Relación PS/Al 1/x	µg Al	PS	Vehículo	µg PS	µg MPL	Relación PS/Al 1/x	µg Al
1	PD	1		10	10	1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10	3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30	4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10	5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10	6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10	6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10	7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10	9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10	14	PD	1		10	10
18C	TT <sub>AH</sub>	3		15	45	18C	TT <sub>AH</sub>	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
MPL BAC 50/200			25	4	100	MPL BAC 50/200			10	4	40
Contenido en aluminio FF				Suma =	355	Contenido en aluminio FF				Suma =	295

b) La misma formulación de sacárido se adyuva con cada uno de los siguientes adyuvantes:

- En la tabla inmediatamente posterior se muestra la concentración de los componentes de la emulsión por dosis de 500 µl.

	Adyuvante A1	Adyuvante A2	Adyuvante A3	
Ingredientes	250 µl de emulsión ac/ag	125 µl de emulsión ac/ag	50 µl de emulsión ac/ag	
alfa Tocoferol	11,88 mg	5,94 mg	2,38 mg	
Escualeno	10,7 mg	5,35 mg	2,14 mg	
Tween 80	4,85 mg	2,43 mg	0,97 mg	
	Adyuvante A4	Adyuvante A5	Adyuvante A6	Adyuvante A7
Ingredientes	250 µl de emulsión ac/ag	250 µl de emulsión ac/ag	125 µl de emulsión ac/ag	50 µl de emulsión ac/ag
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 están 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
- 3 DMPL 50 µg  
QS21 50 µg  
Tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,124 mg
- 10 Tampón NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10,290 mg  
NaCl 2,922 mg  
(100 mM)  
API q.s. ad 0,5 ml disolvente  
pH 6,1
- 15 1. Concentración total de PO<sub>4</sub> = 50 mM

**Composición de Adyuvante B2**

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

Liposomas:

- 20 - DOPC 0,5 mg  
- colesterol 0,125 mg
- 3DMPL 25 mg  
QS21 25 mg  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,124 mg Buffer  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10,290 mg Buffer
- 25 NaCl 2,922 mg  
(100 mM)  
API q.s. ad 0,5 ml disolvente  
pH 6,1

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

**Cualitativo Cuantitativo (por dosis de 0,5 l)**

Emulsión de aceite en agua: 50 µl

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

- 40 3DMPL 50 µg  
QS21 50 µg  
Tampón de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10,470 mg  
Tampón de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10,219 mg  
NaCl 4,003 mg  
(137 mM)  
KCl 0,101 mg  
(2,7 mM)
- 45 API q.s. ad 0,5 ml disolvente  
pH 6,8

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

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

El PS 18C se conjugó con Toxoide Tetánico, el 19F con Toxoide Diftérico, el 19A con Ply detoxicada con formol, el 22F con PhtD y los otros PS con PD.

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

- 5 Los niveles de IgG anti-PS22F por ELISA y títulos de opsono-fagocitosis se cuantificaron en los sueros recolectados el día 42.

El 22F-AH-PhtD demostró ser mucho más inmunogénico que el 22F-PhtD en términos tanto de niveles de IgG (Figura 5) y títulos de opsono-fagocitosis (Figura 6).

10 **Ejemplo 13. Impacto de nuevos adyuvantes sobre la inmunogenicidad de conjugados de PS de la cápsula de *Streptococcus pneumoniae***

Se inmunizaron por vía IM grupos de 40 ratones C57Bl jóvenes los días 0, 14 y 28 con formulaciones de PS de 13 valencias que contenían los PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F (dosis: 0,3 µg / conjugado para los PS 4, 18C, 19A, 19F y 22F y 0,1 µg / conjugado para el resto de PS).

- 15 El PS 18C se conjugó con Toxoide Tetánico, el 19F con Toxoide Diftérico, el 19A con Ply detoxicada con formol, el 22F con PhtD y los otros PS con PD. Véase el Ejemplo 2, la Tabla 1 y el comentario bajo la Tabla 2 para las características de la vacuna de 13 valencias fabricada con 22F conjugado directamente.

Se compararon cuatro formulaciones, suplementadas con AIPO<sub>4</sub>, Adyuvante A1, adyuvante A4 o adyuvante A5.

- 20 Se cuantificaron los niveles de IgG anti-PS, Ply, PhtD y PD por ELISA en los sueros recolectados el día 42 y se agruparon por grupo. Se calculó la siguiente relación para cada antígeno: nivel de IgG inducido con el nuevo adyuvante ensayado / nivel de IgG inducido por AIPO<sub>4</sub>.

Todos los nuevos adyuvantes ensayados mejoraban al menos 2 veces las respuestas inmunitarias de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 22F conjugados en comparación con la formulación clásica de AIPO<sub>4</sub> (Figura 7). No se obtuvo una respuesta fiable para el serotipo 23F en este experimento.

25 **Ejemplo 14. Eficacia protectora de una combinación de PhtD/Ply detoxicada en un modelo de neumonía neumocócica en mono**

- 30 Se inmunizaron por vía intramuscular grupos de 6 monos Rhesus (de 2 a 8 años de edad), que se seleccionaron de entre los pre-existentes que tenían los niveles de anticuerpos anti-19F más bajos, los días 0 y 28 con conjugados de PS de 11 valencias (es decir, 1 µg de PS 1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F, y 3 µg de PS 4, 18C y 19F [de sacarido]) o PhtD (10 µg) + Ply detoxicada con formol (10 µg) o proteína de fusión PhtD/E (10 µg) y Ply detoxicada con formol (10 µg) o solo el adyuvante.

El PS 18C se conjugó con Toxoide Tetánico, el 19F con Toxoide Diftérico y los otros PS con PD. Véase el Ejemplo 2, Tabla 1 y el comentario bajo la Tabla 2 para las características de la vacuna de 11 valencias. Todas las formulaciones se suplementaron con adyuvante C.

- 35 Se inocularon neumococos tipo 19F (5.10<sup>8</sup> ufc) en el pulmón derecho el día 42. Se contaron las colonias en los lavados broncoalveolares recolectados los días 1, 3 y 7 tras el desafío. Los resultados se expresaron como el número de animales por grupos de muertos, con el pulmón colonizado, o libres el día 7 tras el desafío.

Como se muestra en la Figura 8, se obtuvo una buena protección muy próxima a la significación estadística (a pesar del bajo número de animales que se utilizó) con los conjugados de 11 valencias y la combinación PhtD + dPly (p < 0,12, ensayo exacto de Fisher) en comparación con el grupo del adyuvante solo.

40 **Ejemplo 15. Impacto de la conjugación química sobre la respuesta de anticuerpos anti-PhtD y en la eficacia protectora contra un desafío con el tipo 4 inducido por conjugados 22F-PhtD**

- 45 Se inmunizaron por vía intramuscular grupos de 20 ratones OF1 hembras los días 0 y 14 con 3 µg de 22F-PhtD (preparado por química CDAP directa) o 22F-AH-PhtD (PS derivado con ADH), o el adyuvante solo. Ambos conjugados 22F monovalentes se fabricaron por el procedimiento del Ejemplo 2 (véase también la Tabla 1 y la Tabla 2). Cada formulación se suplementó con adyuvante C.

Se cuantificaron los niveles de IgG anti-PhtD por ELISA en los sueros recolectados el día 28.

Los ratones se desafiaron por vía intranasal con 5.10<sup>6</sup> ufc de neumococos tipo 4 el día 29 (es decir, un serotipo neumocócico no cubierto potencialmente por el PS presente en la formulación vacunal ensayada). La mortalidad inducida se controló hasta el día 10 tras el desafío.

- 50 Los resultados que se muestran en la Figura 9 demuestran que el 22F-AH-PhtD inducía una respuesta de IgG anti-PhtD significativamente mayor en comparación con 22F-PhtD. Esto se reflejaba en una mejor protección contra el

desafío con el tipo 4 en comparación con 22F-PhtD como se muestra en la Figura 10.

**Ejemplo 16. Beneficios de la combinación de polisacárido y proteína en la generación de una respuesta inmunitaria protectora**

5 La sinergia potencial entre las respuestas inmunitarias dirigidas contra PhtD y los polisacáridos capsulares se evaluó en el modelo de desafío letal de *S. pneumoniae* en ratón. Los ratones se inmunizaron por vía intramuscular tres veces (D0, 14 y 28) con PhtD. Una hora antes del desafío bacteriano, se transfirieron pasivamente anticuerpos anti-polisacáridos a los ratones (IP, 200 µl). La mortalidad inducida por *S. pneumoniae* se controló hasta los días 8 u 11 tras el desafío. La sinergia de protección se presenta en el presente documento para dos cepas de *S. pneumoniae* (serotipo 3 y serotipo 1).

10 **Modelo de desafío con la cepa 3/43 de *S. pneumoniae*:**

En este experimento, se inmunizaron ratones OF1 con PhtD adsorbida en AIPO4 y se transfirieron pasivamente 1,25 µg de anticuerpos anti-PS3 de cobaya 1 hora antes del desafío con el serotipo 3 de *S. pneumoniae* (Spn 3/43).

15 Los resultados se muestran en la Figura 11. Se observó un 70 % de mortalidad en ratones que habían recibido solo PBS. Se observaba una protección moderada en el grupo de ratones que recibieron anticuerpos anti-PS3 o ratones inmunizados con PhtD. Se obtuvo una sinergia, que daba lugar a casi la protección completa en los ratones que combinaban la inmunización activa y pasiva contra PhtD y PS3, respectivamente.

**Modelo de desafío con el serotipo 1/57 de *S. pneumoniae*:**

20 En este experimento, los ratones OF1 se inmunizaron con PhtD adyuvada con un adyuvante TH1 y se transfirieron pasivamente anticuerpos anti-PS1 de cobaya una hora antes del desafío con el serotipo 1 de *S. pneumoniae* (Spn 1/57).

25 Los resultados se muestran en la Figura 12. Se observaba una alta mortalidad en el grupo de control en el que los ratones recibieron solo adyuvante TH1 (inmunización activa) y PBS (inmunización pasiva). Se observó una protección moderada en el grupo de ratones que recibieron anticuerpos anti-PS1 (un 55 % de supervivencia) o los ratones inmunizados con PhtD (un 25 % de supervivencia). Se obtenía una sinergia, que daba lugar casi a la protección completa, en ratones en los que se combinaba la inmunización activa y pasiva contra PhtD y PS1, respectivamente.

Estos datos apoyan el efecto sinérgico de las respuestas inmunitarias dirigidas contra una proteína neumocócica (es decir, PhtD) y los polisacáridos capsulares en el mecanismo de protección contra la infección por *S. pneumoniae*.

30 **Ejemplo 17. Impacto de los conjugados neumocócicos PS-TT y PS-DT sobre la respuesta inmunitaria dirigida contra el resto de conjugados neumocócicos PS-PD en una formulación de 11 valencias**

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

35 Los ratones se inmunizaron por vía intramuscular tres veces con 1/10 de dosis humana de las vacunas (0,1 µg de PS). Se recolectaron las muestras de sangre el día 42 y se midió la respuesta inmunitaria contra el polisacárido por ELISA.

Se inmunizaron las cobayas por vía intramuscular tres veces con 1/4 de la dosis humana de las vacunas (0,25 µg de PS). Se co-administró Infanrix Hexa con el fin de imitar la situación humana. Se recolectaron las muestras de sangre el día 42 y se midió la respuesta inmunitaria dirigida contra cada polisacárido por EISA.

40 **Experimento N° SPN115 (pims 20040304) Ratón**

ELISA			
		Todos con PD 1 µg	6B-TTAH 1 µg 23F-TTAH 1 µg 18C-DTAH 1 µg 19F-DT 1 µg 1/4-PD 1 µg otros con PD 1 µg
<b>1</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>6,148</b> 4,54-8,33 100 %	<b>19,961*</b> 14,73-27,05 100 %

ES 2 626 662 T3

(continuación)

ELISA			
		Todos con PD 1 µg	6B-TTAH 1 µg 23F-TTAH 1 µg 18C-DTAH 1 µg 19F-DT 1 µg 1/4-PD 1 µg otros con PD 1 µg
<b>3</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI %</b> <b>sero+</b>	<b>1,763</b> 1,223 - 2,542 100 %	<b>2,483</b> 1,693 - 3,643 100 %
<b>4</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI %</b> <b>sero+</b>	<b>3,643</b> 2,498 - 5,311 100 %	<b>11,849*</b> 8,909 - 15,759 100 %
<b>5</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI %</b> <b>sero+</b>	<b>2,291</b> 1,575 - 3,332 100 %	<b>5,154*</b> 3,829 - 6,939 100 %
<b>6B</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>0,048</b> 0,031 - 0,075 44 %	<b>0,537*</b> 0,342 - 0,843 100 %
<b>7F</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>0,297</b> 0,22-0,41 100 %	<b>0,774</b> 0,48-1,25 100 %
<b>9V</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>2,098</b> 1,575-2,793 100 %	<b>8,098*</b> 6,507-10,078 100 %
<b>14</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>4,983</b> 3,742-6,634 100 %	<b>9,327*</b> 7,669-11,344 100 %
<b>18C</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>0,469</b> 0,32-0,69 100 %	<b>3,274*</b> 2,67-4,01 100 %
<b>19F</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>3,052</b> 2,14-4,35 100 %	<b>21,274*</b> 16,54-27,37 100 %
<b>23F</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>0,072</b> 0,044 - 0,117 38 %	<b>1,209</b> 0,457-3,2 71 %

Experimento N° SPN116 (pims 20040308) Cobaya

ELISA			
		Todos con PD 1 µg	6B-TTAH 1 µg 23F-TTAH 1 µg 18C-DTAH 1 µg 19F-DT 1 µg 1/4-PD 1 µg otros con PD 1 µg
<b>1</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>8,244</b> 4,745 - 14,324 100 %	<b>33,479*</b> 21,507 -52,114 100 %

(continuación)

ELISA			
		Todos con PD 1 µg	6B-TTAH 1 µg 23F-TTAH 1 µg 18C-DTAH 1 µg 19F-DT 1 µg 1/4-PD 1 µg otros con PD 1 µg
<b>3</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>2,348</b> 1,42-3,89 100 %	<b>1,619</b> 0,84 - 3,13 100 %
<b>4</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>9,211</b> 5,535 - 15,238 100 %	<b>19,033</b> 10,816 - 33,494 100 %
<b>5</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>14,04</b> 9,967 - 19,776 100 %	<b>14,791</b> 10,227 - 21,392 100 %
<b>6B</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>0,491</b> 0,292 - 0,825 100 %	<b>1,667</b> 0,746 - 3,726 100 %
<b>7F</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>10,467</b> 5,979 - 18,324 100 %	<b>37,49*</b> 21,944 - 64,051 100 %
<b>9V</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>5,459</b> 3,106 - 9,589 100 %	<b>10,309</b> 6,183 - 17,187 100 %
<b>14</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>1,235</b> 0,686-2,224 100 %	<b>4,358*</b> 2,073-9,161 100 %
<b>19F</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>7,769</b> 5,617-10,745 100 %	<b>15,933*</b> 12,036-21,092 100 %
<b>18C</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>2,373</b> 1,297 - 4,341 100 %	<b>8,744*</b> 5,128 - 14,908 100 %
<b>23F</b>	<b>GMC</b> <b>95 % CI</b> <b>% sero+</b>	<b>5,621</b> 3,289 - 9,608 100 %	<b>33,791*</b> 20,838 - 54,797 100 %

5 Se observó un aumento de la respuesta inmunitaria dirigida contra la mayoría de los polisacáridos conjugados con PD tanto en ratones como en cobayas con la formulación que contenía dos polisacáridos conjugados con TT (PS 6B y 23F) y DT (PS 18C y 19F) cuando se comparaba con la formulación con PD de 11V. Estas diferencias eran significativamente estadísticamente contra los PS 1, 4, 5, 9V y 14 así como contra los PS 1, 7F y 14 en ratones y cobayas respectivamente.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende al menos 7 conjugados de sacárido capsular de *S. pneumoniae* incluyendo los conjugados de sacáridos de los serotipos 19A y 19F en la que 19A se conjuga a un primer toxoide bacteriano y 19F se conjuga con un segundo toxoide bacteriano y 2-9 sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* se conjugan con la proteína D, en la que la mitad o una minoría de los sacáridos capsulares se conjugan con la proteína D.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 en la que el primer toxoide bacteriano es una proteína diferente respecto al segundo toxoide bacteriano.
- 10 3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 o 2 en la que el primer toxoide bacteriano se selecciona de entre el grupo que consiste en toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197, toxoide pertussis, una citolisina bacteriana y neumolisina.
4. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la que el segundo toxoide bacteriano se selecciona de entre el grupo que consiste en toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197, toxoide pertussis, una citolisina bacteriana y neumolisina.
- 15 5. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende conjugados de sacáridos capsulares de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C y 23F de *S. pneumoniae*.
6. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-5 que comprende conjugados de sacáridos capsulares de los serotipos 1, 5 y 7F de *S. pneumoniae*.
- 20 7. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-6 que comprende un conjugado del sacárido capsular del serotipo 22F de *S. pneumoniae*.
8. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-7 que comprende un conjugado del sacárido capsular del serotipo 3 de *S. pneumoniae*.
9. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-8 que comprende un conjugado del sacárido capsular del serotipo 6A de *S. pneumoniae*.
- 25 10. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en la que se conjugan por separado 3 diferentes vehículos proteicos con al menos 3 sacáridos capsulares de serotipos de *S. pneumoniae*.
11. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-10 que comprende 3, 4, 5 o 6 vehículos proteicos que se seleccionan de entre la siguiente lista: toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197, neumolisina, Proteína D y PhtD.
- 30 12. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente que comprende adicionalmente una o más proteínas de *S. pneumoniae* conjugadas o no conjugadas.
13. La composición inmunogénica de la reivindicación 12 en la que dicha una o más proteínas de *S. pneumoniae* se seleccionan de entre la familia de tríadas de polihistidina (PhtX), familia de proteínas de unión a la colina (CbpX), CbpX truncadas, familia LytX, LytX truncadas, proteínas quiméricas CbpX truncada- LytX truncada, neumolisina detoxificada (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133.
- 35 14. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que comprende neumolisina como vehículo proteico o libre.
15. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que comprende una proteína PhtX como vehículo proteico o libre.
- 40 16. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que comprende adicionalmente un adyuvante.
17. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45 18. Un procedimiento de fabricación de una vacuna de acuerdo con la reivindicación 17 que comprende la etapa de mezclar la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
19. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-16 o la vacuna de la reivindicación 17 para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad producida por la infección con *Streptococcus pneumoniae*.
- 50 20. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-16 o la vacuna de la reivindicación 17 para su uso de acuerdo con la reivindicación 19 en la que la enfermedad es cualquiera o ambas de neumonía o enfermedad neumocócica invasiva (IPD) de seres humanos ancianos, exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva

crónica (EPOC) de seres humanos ancianos, meningitis y/o bacteriemia de seres humanos infantiles, otitis media de seres humanos infantiles o neumonía y/o conjuntivitis de seres humanos infantiles.



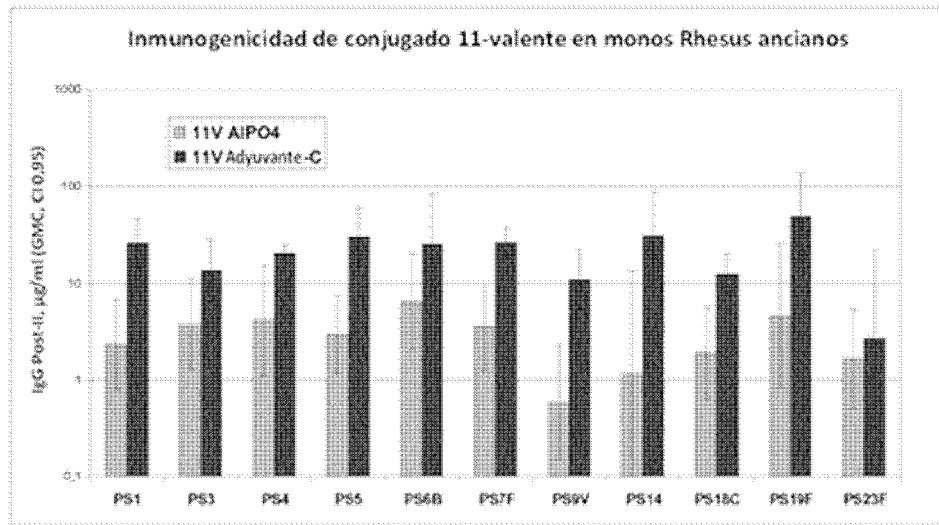


Figura 1

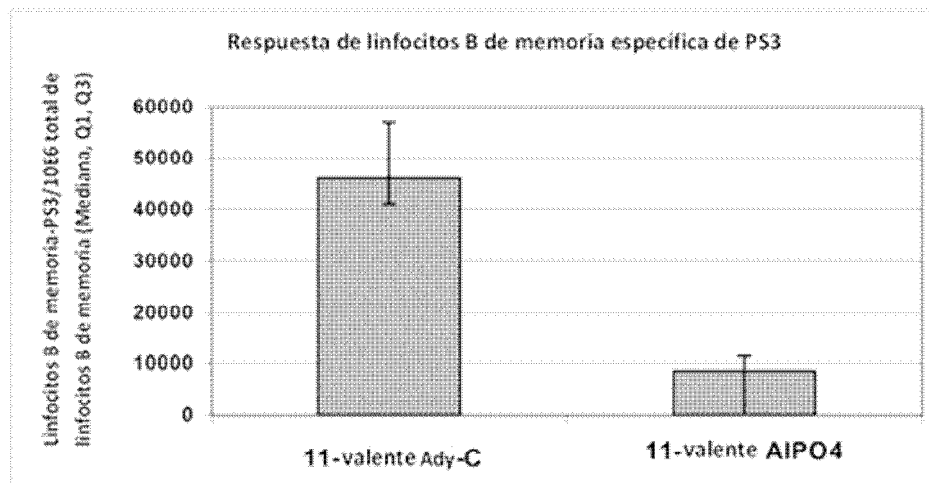


Figura 2

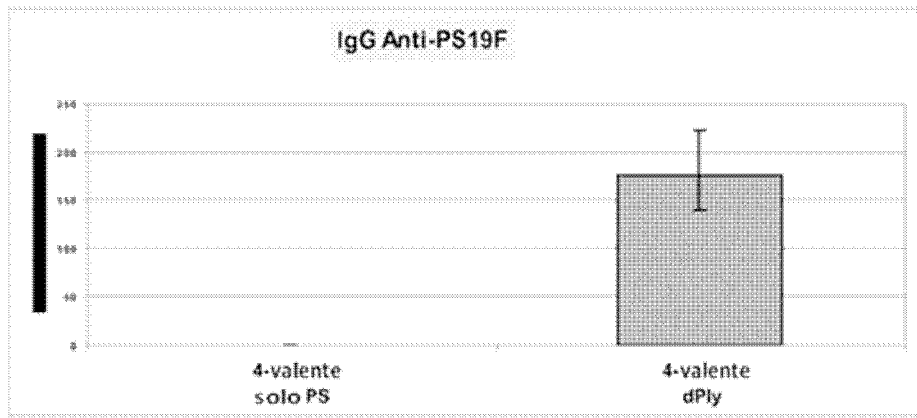


Figura 3

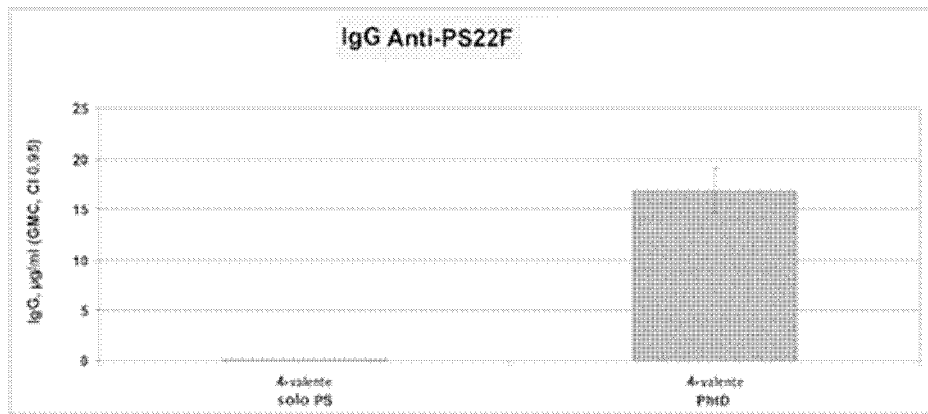


Figura 4

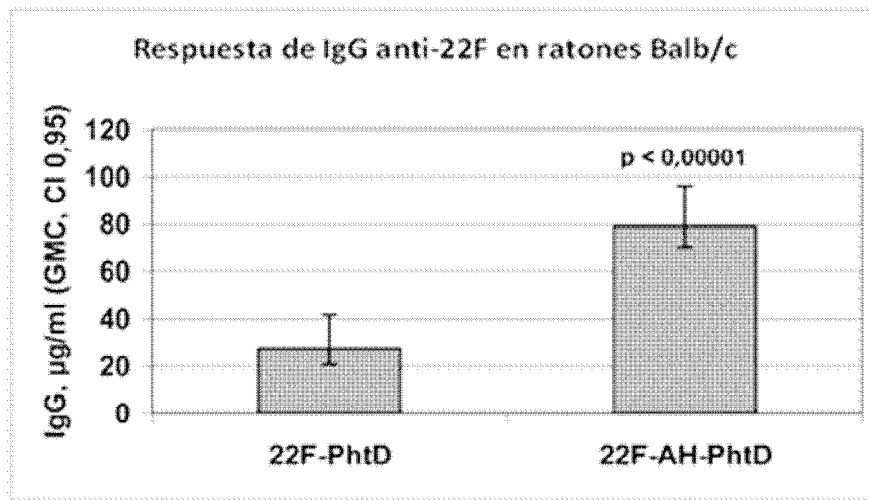


Figura 5

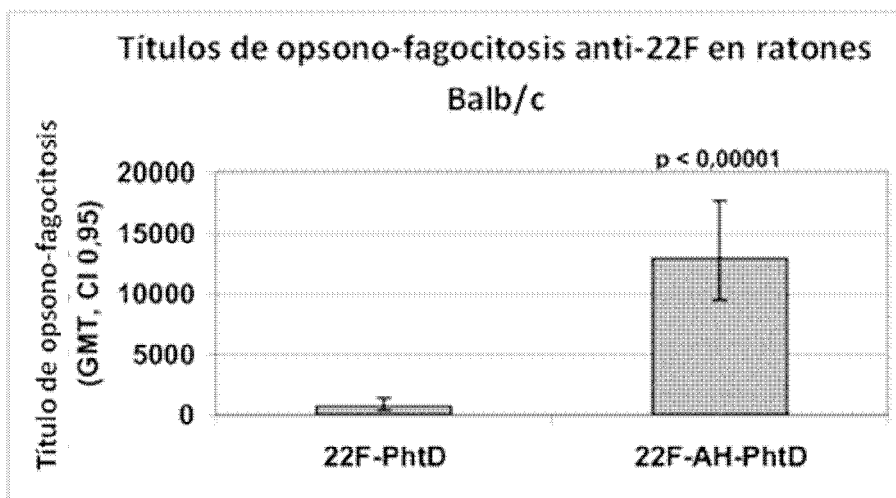


Figura 6

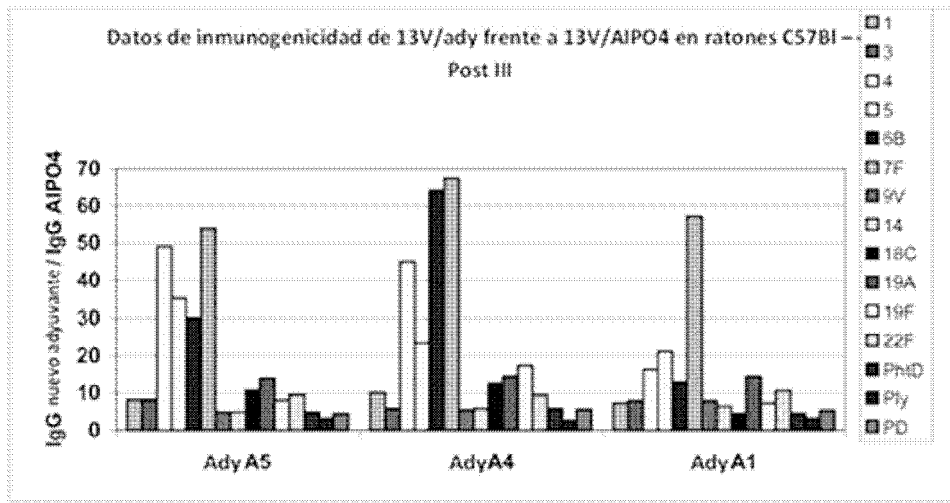


Figura 7

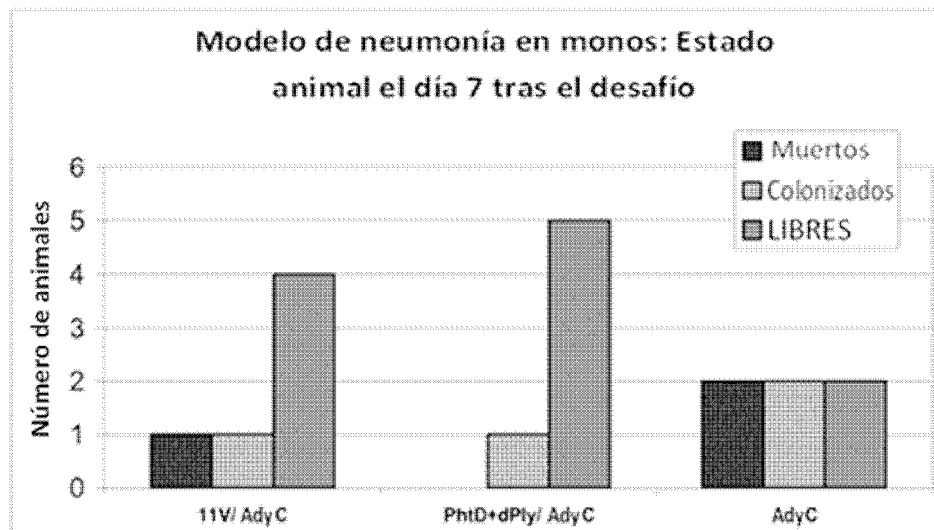


Figura 8

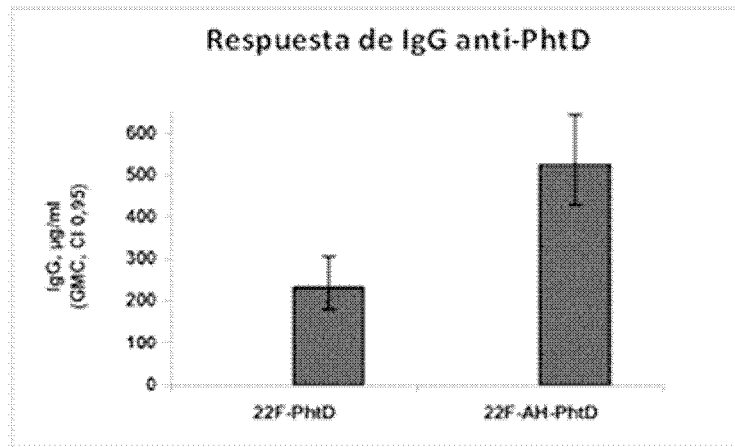


Figura 9

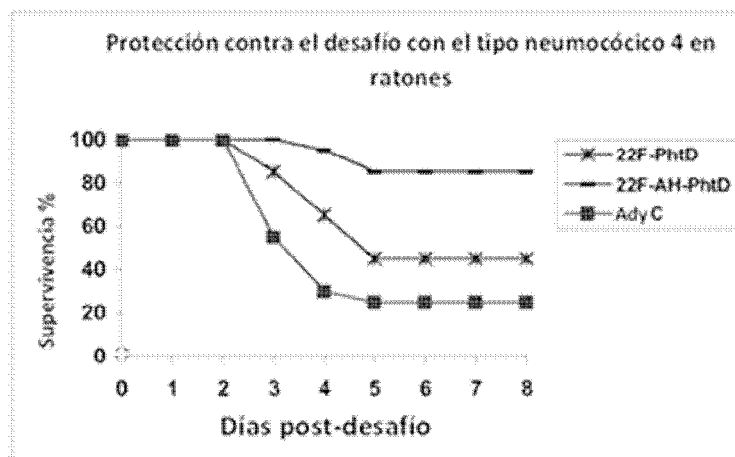


Figura 10

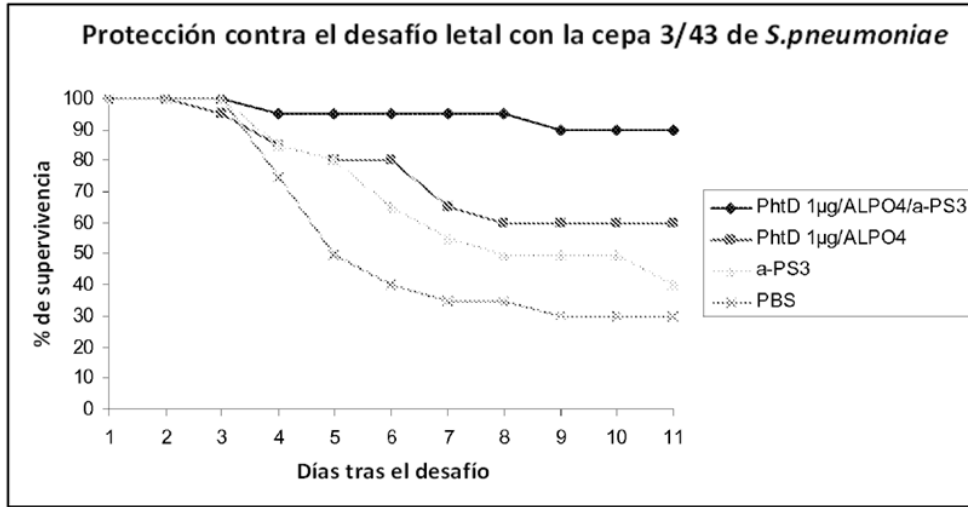


Figura 11

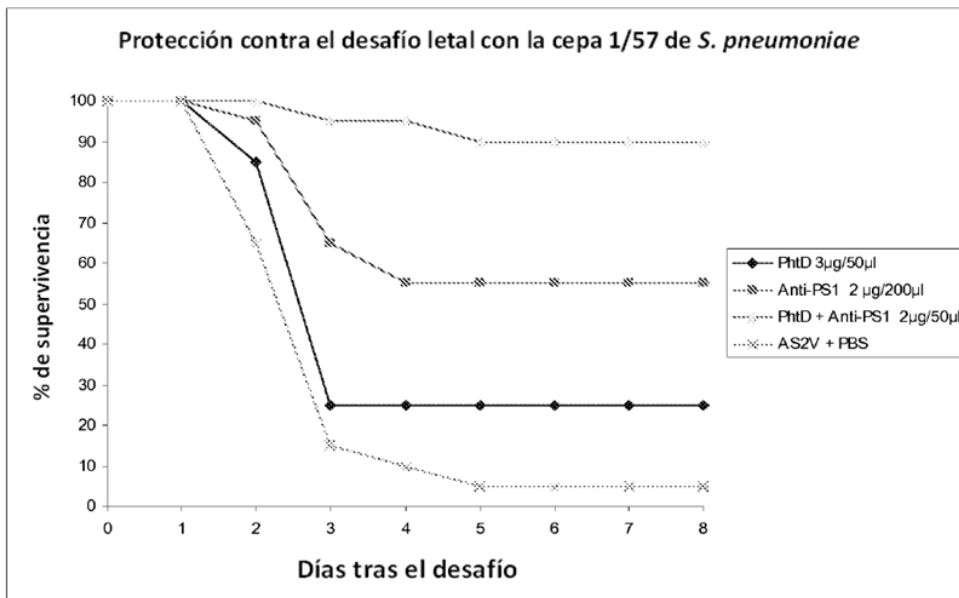


Figura 12

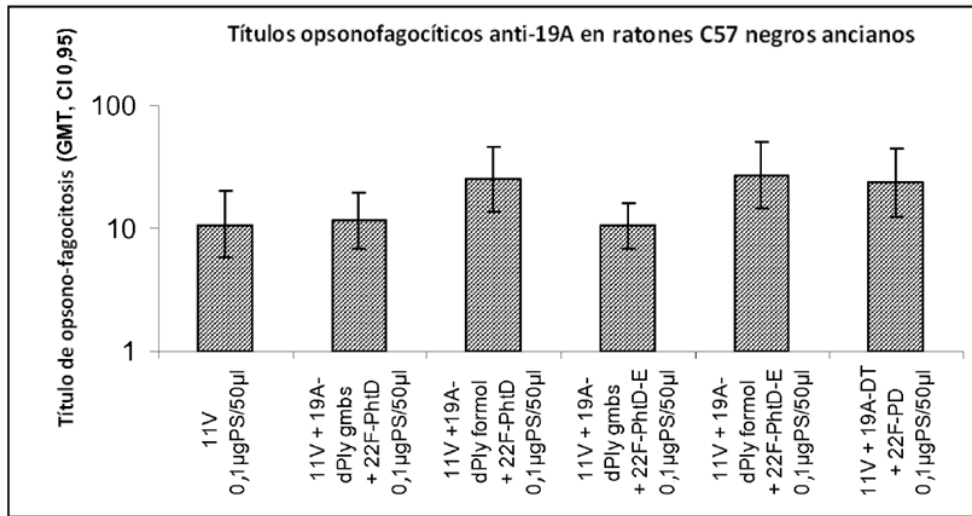


Figura 13

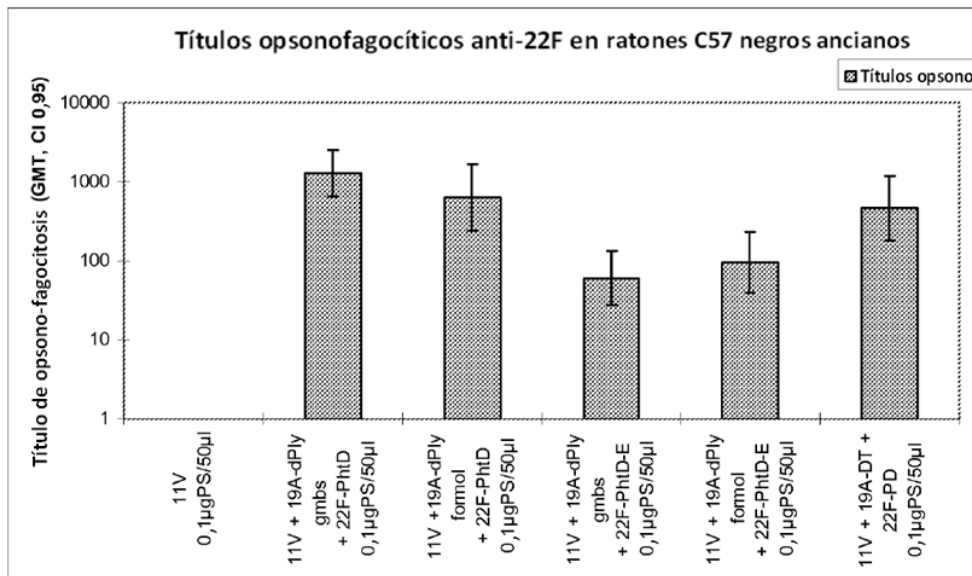


Figura 14

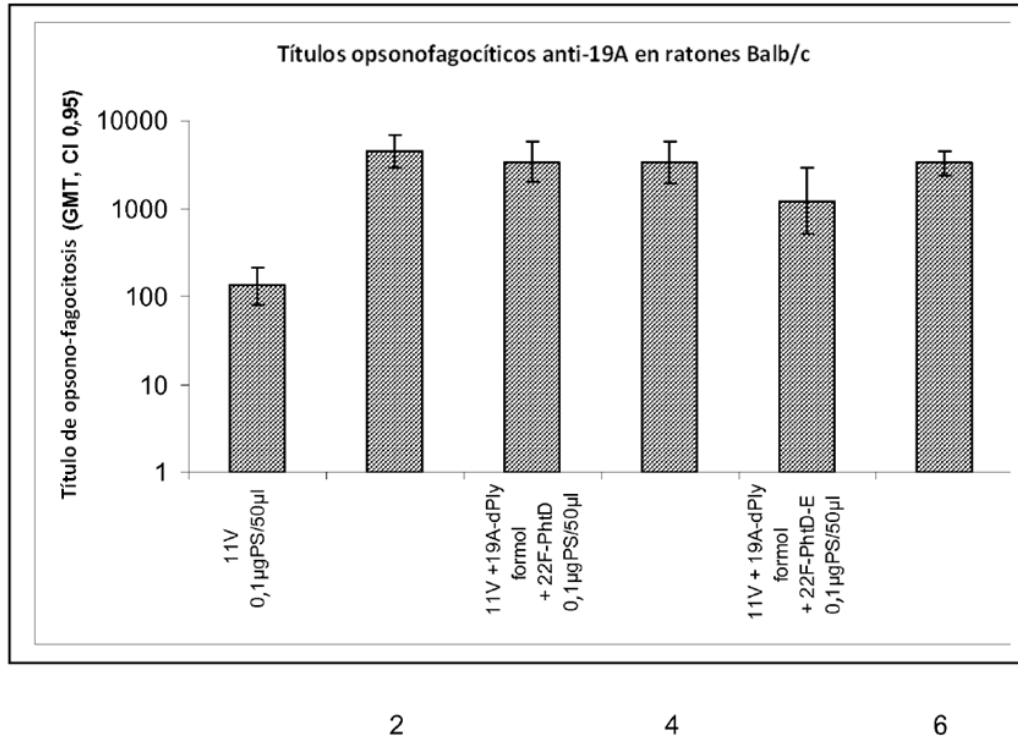


Figura 15

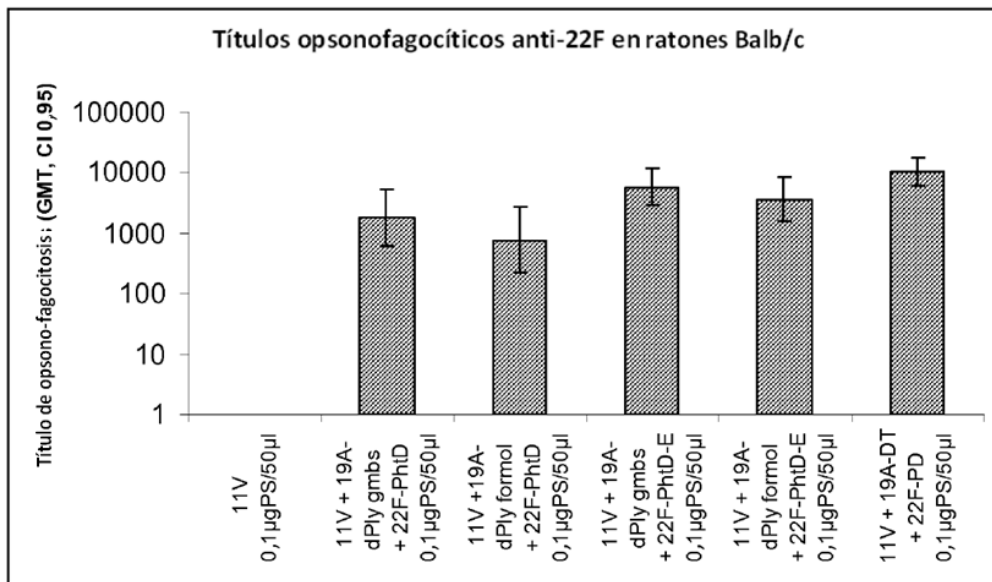


Figura 16



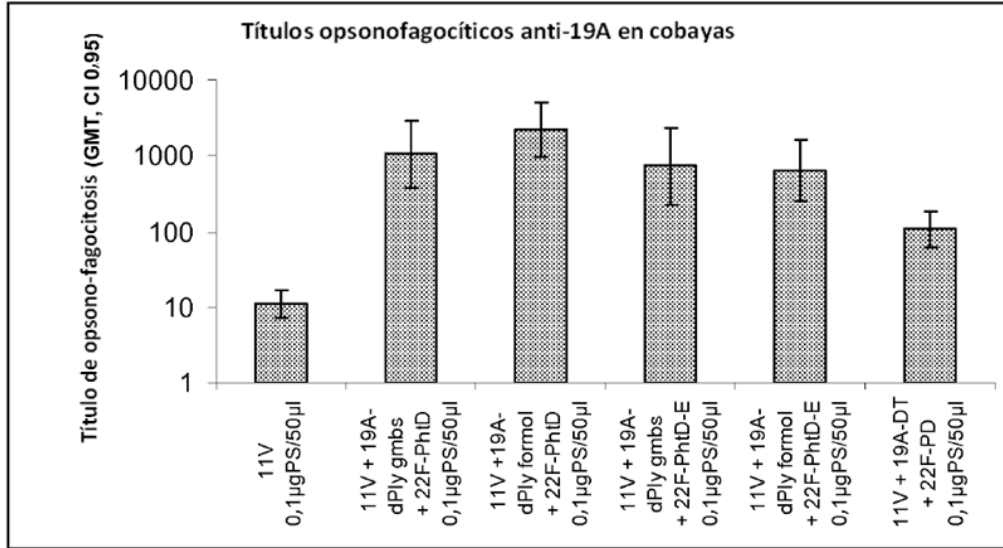


Figura 17

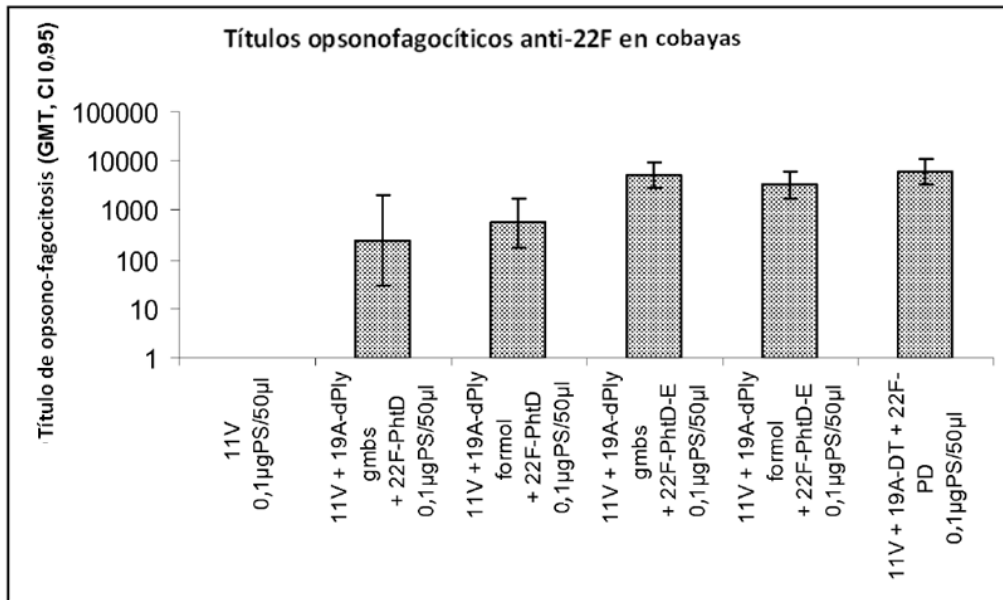
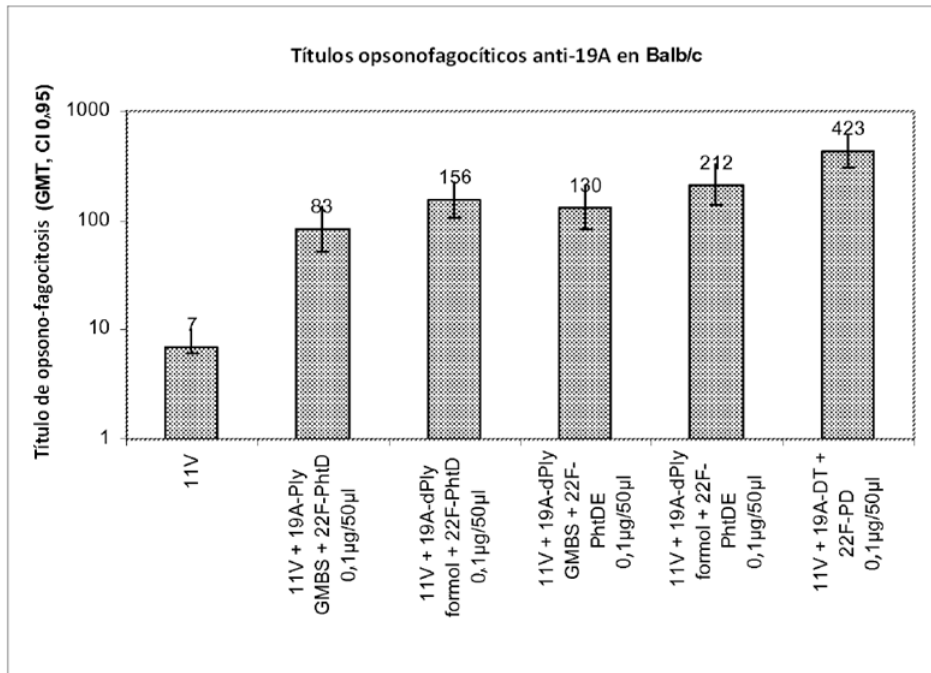
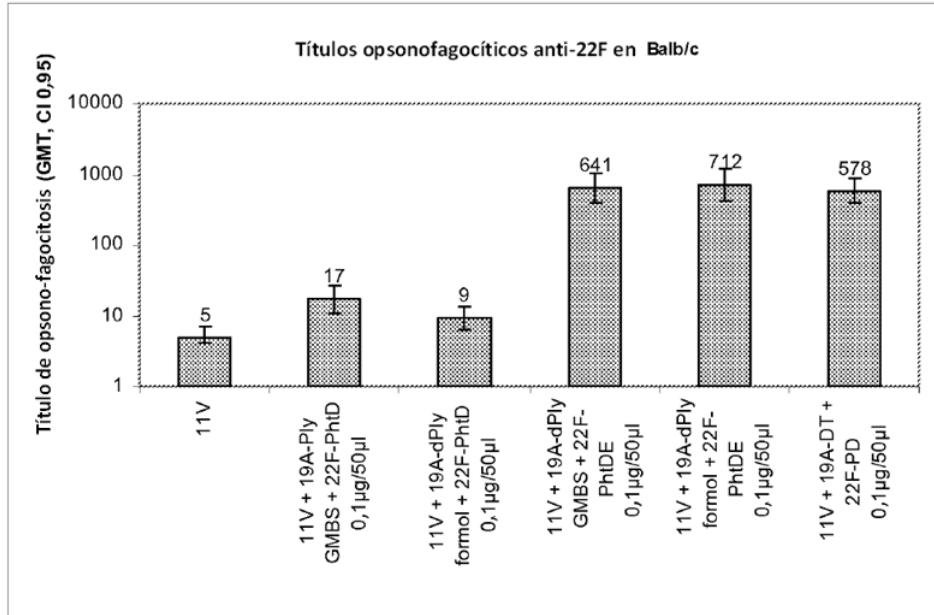


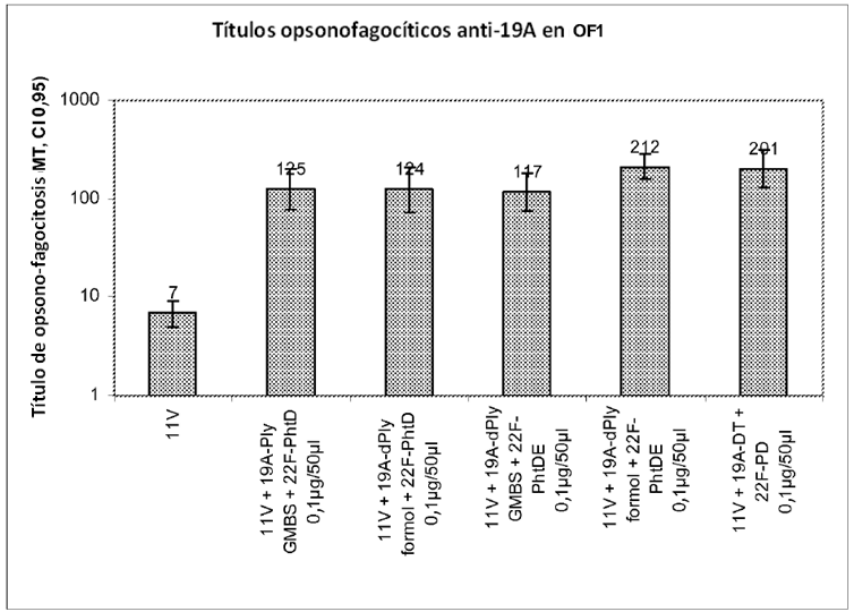
Figura 18



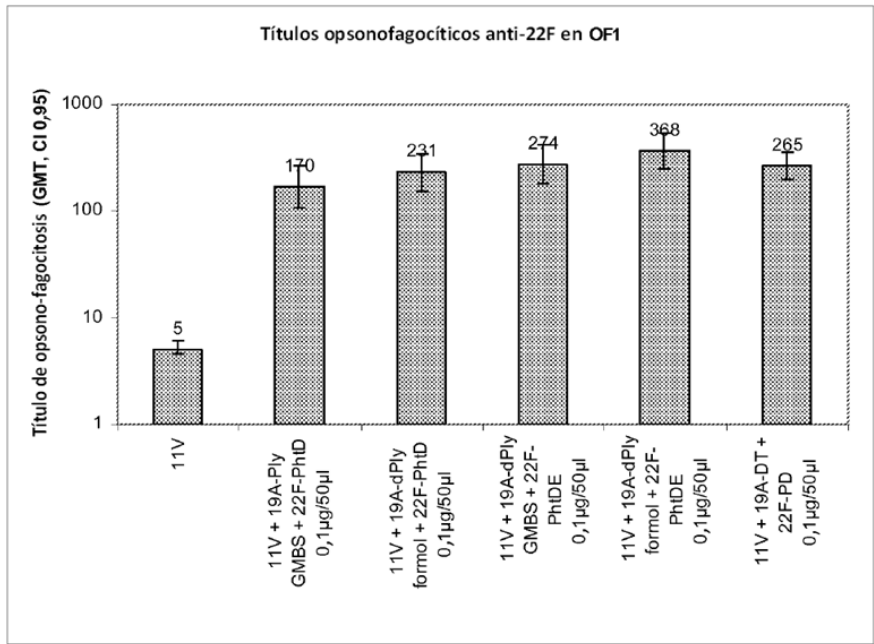
**Figura 19**



**Figura 20**



**Figura 21**



**Figura 22**