

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 511**

51 Int. Cl.:

A61K 39/05 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/10 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2009 PCT/IB2009/007926**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2010 WO10067201**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2009 E 09808956 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2376112**

54 Título: **Mezcla de vacunas meningocócicas liofilizadas con vacunas de D-T-Pa**

30 Prioridad:

11.12.2008 GB 0822633

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

03.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CONTORNI, MARIO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 628 511 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

Mezcla de vacunas meningocócicas liofilizadas con vacunas de D-T-Pa

Campo técnico

5 La presente invención está en el campo de la formulación de vacunas de combinación para inmunizar frente a difteria, tétanos, tos ferina y meningitis meningocócica.

Antecedentes de la invención

10 Las vacunas que contienen antígenos de más de un organismo patógeno en una dosis individual se conocen como vacunas "multivalentes" o de "combinación", por ejemplo, las vacunas de difteria, tétanos y tos ferina ("DTP") y las vacunas de sarampión, paperas y rubéola ("MMR"). Las vacunas de combinación ofrecen a los pacientes la ventaja de recibir un número reducido de inyecciones, lo que conduce a la ventaja clínica de un aumento de cumplimiento (por ejemplo, véase el capítulo 29 de la referencia 1), particularmente para vacunación pediátrica. Sin embargo, al mismo tiempo, presentan dificultades debidas a factores que incluyen: incompatibilidad física y bioquímica entre antígenos y otros componentes; interferencia inmunológica; y estabilidad. Algunas de estas dificultades se pueden abordar mediante la formulación adecuada de la vacuna.

15 Las vacunas DTP se han combinado anteriormente con conjugados meningocócicos. Por ejemplo, la referencia 2 preparó una vacuna completamente líquida 8-valente de D-T-Pw-HBsAg-Hib-MenC-MenW135-MenY. También desvela vacunas preparadas por mezcla de componentes acuosos de D-T-Pw-HBsAg con mezclas liofilizadas de conjugados meningocócicos. Se desvela una formulación líquida/liofilizada similar en la referencia 3, donde se preparó una vacuna de combinación 7-valente mediante el uso de una vacuna de combinación líquida 4-valente de D-T-Pw-HBsAg (TRITANRIX HEPB™) para reconstituir un componente de conjugado liofilizado de Hib-MenA-MenC (véanse también las referencias 29, 30, 76 y 99). De forma similar, la referencia 4 preparó una vacuna de combinación 7-valente mediante el uso de una vacuna de combinación líquida 5-valente de D-T-Pa-IPV-HBsAg (INFANRIX PENTA™) para reconstituir un componente de conjugado liofilizado de MenC-MenY. La concentración de antígeno y adyuvante en estos tres documentos fueron, por mililitro:

	<i>Ref. 2</i>	<i>Ref. 3</i>	<i>Ref. 4</i>
<i>Toxoide de la difteria</i>	15 Lf	15 Lf	50 Lf
<i>Toxoide del tétanos</i>	6,5 Lf	6,5 Lf	20 Lf
<i>Tos ferina</i>	Pw: 30 OU	Pw: 30 OU	Pa: 50 µg PT, 50 µg FHA, 16 µg PRN
<i>Al⁺⁺⁺</i>	0,6 mg	1,26 mg	1,4 mg

25

El ejemplo 13 del documento de Patente US2005/0002948 A1 desvela un ensayo clínico en el que se administra un refuerzo de Td simultáneamente con TetraMenD a pacientes con una edad de 11 a 17 años.

30 Es un objetivo de la invención proporcionar formulaciones adicionales y mejoradas para vacunas de combinación que incluyen antígenos de difteria, tétanos, tos ferina y meningocócicos, especialmente formulaciones que sean útiles para inmunización de adolescentes (por ejemplo, refuerzos).

Divulgación de la invención

35 De acuerdo con la invención, se usa un componente líquido que contiene antígenos de D-T-Pa para reconstituir un componente meningocócico liofilizado. En comparación con las referencias 2 a 4, se usa un contenido menor de toxoide de la difteria, de un modo tal que las composiciones reconstituidas finales incluyen ≤ 10 Lf/ml de toxoide de la difteria. A diferencia de las referencias 2 a 4, el contenido de toxoide de la difteria es menor que el contenido de toxoide del tétanos (medido en unidades Lf). En algunas realizaciones, también se usa un bajo contenido de toxoide de la tos ferina (< 25 µg/ml). También se puede usar un bajo contenido de aluminio ($< 0,84$ mg/ml, medido como Al⁺⁺⁺).

40 Mediante el uso de antígenos de tos ferina acelulares ("Pa"), en lugar de antígenos de tos ferina celulares ("Pw"), las vacunas de la invención se pueden caracterizar con más facilidad, de forma más consistente y menos reactogénica que las vacunas de las referencias 2 y 3.

45 Mediante el uso de un contenido de toxoide de la difteria menor que la técnica anterior, las vacunas de la invención ofrecen una reactogenicidad menor y además, en adolescentes, abordan el potencial de supresión epitópica inducida por vehículo, en la que el uso en exceso de un componente proteico, ya sea como un inmunógeno o como una proteína vehículo de conjugado, puede dar como resultado una eficacia reducida (véase también la introducción de la referencia 5). Como la vacunación pediátrica de rutina implica en la actualidad la administración de diversos derivados de la toxina de la difteria (los niños reciben el toxoide de la difteria en vacunas de la difteria y como

proteína vehículo de la vacuna de conjugado meningocócico 4-valente MENACTRA™, y reciben el mutante CRM197 de la toxina de la difteria como proteína vehículo en diversas vacunas de conjugado, que incluyen HIBTITER™, PREVENAR™, MENJUGATE™ y MENINGITEC™) entonces es útil reducir la cantidad de toxoide de la difteria administrada en las vacunas, particularmente en vacunas de refuerzo de adolescentes. La dosificación menor del componente que contiene DTPa también ayuda a mantener una dosis global menor de toxoide de la difteria cuando un conjugado meningocócico usa toxoide de la difteria o un mutante del mismo como vehículo.

Mediante el uso de un contenido de toxoide del tétanos menor que la vacuna DTPa de la técnica anterior de la referencia 4 (por ejemplo, ≤ 15 Lf/ml), se pueden preparar vacunas que aborden el potencial de supresión epitópica inducida por vehículo cuando la vacunación pediátrica implique un vehículo de toxoide del tétanos, por ejemplo, del producto HIBERIX™. La dosificación menor en el componente que contiene DTPa también ayuda a mantener una dosis global menor de toxoide del tétanos cuando un conjugado meningocócico usa toxoide del tétanos como vehículo.

También se ha informado que la reducción del contenido de toxoide de la tos ferina [6] y de la dosis de aluminio [7] es ventajosa en adolescentes.

De ese modo, la invención proporciona un kit para su uso en el refuerzo de la respuesta inmunitaria de un paciente de una edad entre 10 y 18 años que ha sido inmunizado previamente frente a (a) difteria, tétanos y tos ferina o (b) difteria, tétanos, tos ferina y meningitis meningocócica que comprende: (i) un componente acuoso, que comprende una mezcla de toxoide de la difteria, toxoide del tétanos y antígenos de la tos ferina acelulares, en el que la concentración de toxoide de la difteria es ≤ 10 Lf/ml y en el que el contenido de toxoide de la difteria medido en unidades Lf es menor que el contenido de toxoide del tétanos medido en unidades Lf; y (ii) un componente liofilizado, que comprende sacáridos capsulares conjugados de los serogrupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*. Para la administración a un paciente, se combinan los componentes acuoso y liofilizado, para dar una vacuna líquida combinada que es adecuada para inyección.

Por lo tanto, la invención también proporciona una vacuna líquida combinada para su uso en el refuerzo de la respuesta inmunitaria de un paciente de una edad entre 10 y 18 años que ha sido inmunizado previamente frente a (a) difteria, tétanos y tos ferina o (b) difteria, tétanos, tos ferina y meningitis meningocócica que comprende toxoide de la difteria, toxoide del tétanos, antígenos de la tos ferina acelulares y sacáridos capsulares conjugados de los serogrupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*, en la que la concentración de toxoide de la difteria es ≤ 10 Lf/ml y el contenido de toxoide de la difteria medido en unidades Lf es menor que el contenido de toxoide del tétanos medido en unidades Lf y en la que la vacuna incluye uno o más estabilizadores de liofilización.

En la totalidad de estas realizaciones, el componente acuoso incluirá por lo general un adyuvante, tal como una o más sales de aluminio. En tales componentes, el contenido de aluminio es habitualmente menor que 1,7 mg/ml, y puede ser menor que 0,84 mg/ml, como se explica con mayor detalle posteriormente. El componente liofilizado también puede incluir un adyuvante, o en su lugar puede estar sin adyuvante.

En la totalidad de estas realizaciones, la concentración de toxoide de la tos ferina en el componente acuoso será por lo general menos que 25 μ g/ml.

Componente líquido

Los kits y los procedimientos de la invención implican el uso de un componente antigénico acuoso que incluye una mezcla de toxoide de la difteria, toxoide del tétanos y antígenos de la tos ferina acelulares. La concentración de toxoide de la difteria en el componente acuoso es ≤ 10 Lf/ml, por ejemplo < 5 Lf en un volumen de dosis de 0,5 ml. La concentración de toxoide del tétanos en el componente acuoso es habitualmente ≤ 15 Lf/ml, por ejemplo $< 7,5$ Lf en un volumen de 0,5 ml. La concentración de toxoide de la difteria es menor que la concentración de toxoide del tétanos, midiéndose ambas concentraciones en unidades Lf.

La toxina de la difteria se produce por *Corynebacterium diphtheriae*, la causa de la difteria. La toxina se puede tratar (por ejemplo, usando formalina o formaldehído) para retirar toxicidad mientras se retiene la capacidad de inducir anticuerpos específicos anti-toxina después de inyección. Estos toxoides de la difteria se usan en vacunas de la difteria, y se desvelan con mayor detalle en el capítulo 13 de la referencia 1. Los toxoides de la difteria preferentes son los preparados por tratamiento con formaldehído. El toxoide de la difteria se puede obtener por crecimiento de *C. diphtheriae* en medio de crecimiento (por ejemplo, medio de Fenton, o medio de Linggoud y Fenton), que se puede complementar con extracto bovino, seguido de tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material de toxoide se puede tratar a continuación mediante un procedimiento que comprende filtración estéril o diálisis.

La toxina del tétanos se produce por *Clostridium tetani*, la causa del tétanos. Como la difteria, la toxina del tétanos se puede tratar para dar un toxoide protector. Los toxoides se usan en vacunas del tétanos, y se desvelan con mayor detalle en el capítulo 27 de la referencia 1. Los toxoides preferentes del tétanos son los que se preparan por tratamiento con formaldehído. El toxoide del tétanos se puede obtener por crecimiento de *C. tetani* en medio de crecimiento (por ejemplo, un medio de Latham obtenido a partir de caseína bovina), seguido de tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material se puede tratar después mediante un procedimiento que

comprende filtración estéril y/o diálisis.

La *Bordetella pertussis* causa la tos ferina. Los antígenos de la tos ferina de las vacunas comerciales son celulares (célula completa, en la forma de células inactivadas de *B. pertussis*; "Pw") o acelulares (antígenos específicos de *B. pertussis* purificados; "Pa"). La invención usa antígenos de la tos ferina acelulares, que habitualmente incluyen uno, dos o (preferentemente) tres de los siguientes antígenos purificados: (1) toxina de la tos ferina inactivada (toxoides de la tos ferina, o "PT"); (2) hemaglutinina filamentososa ("FHA"); (3) pertactina (también conocida como "proteína de membrana exterior de 69 kiloDalton" o "PRN"). Estos tres antígenos se pueden preparar por aislamiento de un cultivo de *B. pertussis* que ha crecido en medio líquido modificado de Stainer-Scholte. La toxina de la tos ferina y la FHA se pueden aislar del caldo de fermentación (por ejemplo, por adsorción sobre gel de hidroxapatita), mientras que la pertactina se puede extraer de las células por tratamiento térmico y floculación (por ejemplo, usando cloruro de bario). Los antígenos se pueden purificar en etapas cromatográficas y/o de precipitación sucesivas. La toxina de la tos ferina y la FHA se pueden purificar, por ejemplo, por cromatografía hidrófoba, cromatografía por afinidad y cromatografía por exclusión de tamaño. La pertactina se puede purificar, por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba y cromatografía por exclusión de tamaño. La FHA y la pertactina se pueden tratar con formaldehído antes del uso de acuerdo con la invención. La toxina de la tos ferina se puede inactivar (destoxificar), para dar PT, por tratamiento con formaldehído y/o glutaraldehído; como alternativa a este procedimiento de detoxificación química, PT puede ser una toxina mutante en la que se ha reducido la actividad enzimática mediante mutagénesis [8] (por ejemplo, el mutante 9K/129G [9]), pero la detoxificación por tratamiento químico es más habitual. Además del PT, la FHA y la pertactina, también es posible incluir fimbrias (por ejemplo, aglutinógenos 2 y 3) en un componente de antígeno de la tos ferina acelular.

La concentración de toxoides de la difteria en el componente acuoso es ≤ 10 Lf/ml (es decir, ≤ 5 Lf en un volumen de dosis de 0,5 ml). Dentro de este intervalo, una concentración habitual de toxoides de la difteria está entre 2 Lf/ml y 7 Lf/ml o entre 3 Lf/ml y 6 Lf/ml. Las concentraciones preferentes son aproximadamente 4 Lf/ml o aproximadamente 5 Lf/ml. La unidad "Lf" ("unidades de floculación" o "dosis de floculación calcárea") se define como la cantidad de toxoide que, cuando se mezcla con una Unidad Internacional de antitoxina, produce una mezcla de floculación óptima [10]. Para medir estas cantidades, el NIBSC, por ejemplo, suministra "Toxoide de Difteria, Normal" [11], que contiene 300 Lf por ampolla, y también suministra el "1° reactivo de referencia internacional para toxoide de la difteria para ensayo de floculación" [12] que contiene 900 Lf por ampolla.

La concentración de toxoide del tétanos en el componente acuoso puede estar en el intervalo de 1-30 Lf/ml. Dentro de este intervalo, una concentración habitual de toxoide del tétanos está entre 5 Lf/ml y 25 Lf/ml o entre 8 Lf/ml y 15 Lf/ml. Idealmente, el contenido es < 15 Lf/ml, y preferentemente es aproximadamente 10 Lf/ml. Para medir las unidades Lf, el NIBSC, por ejemplo, suministra el "1° reactivo de referencia internacional para toxoide del tétanos para ensayo de floculación" [13] que contiene 1000 Lf por ampolla.

El contenido de toxoide de la difteria es menor que el contenido de toxoide del tétanos, medido en unidades Lf, por ejemplo, una proporción D:T entre 1:2 y 1:4, por ejemplo aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:2,5 o aproximadamente 1:3.

Cuando el componente acuoso incluye PT en un antígeno de la tos ferina acelular, su concentración puede estar en el intervalo de 1 μ g/ml a 100 μ g/ml o entre 2 μ g/ml y 55 μ g/ml. Una concentración inferior a 25 μ g/ml o inferior a 18 μ g/ml es particularmente útil, por ejemplo aproximadamente 5 μ g/ml, aproximadamente 10 μ g/ml, aproximadamente 15 μ g/ml, aproximadamente 16 μ g/ml.

Cuando el componente acuoso incluye FHA en un antígeno de la tos ferina acelular, su concentración puede estar en el intervalo de 1 μ g/ml a 100 μ g/ml o entre 5 μ g/ml y 55 μ g/ml, por ejemplo aproximadamente 5 μ g/ml, aproximadamente 10 μ g/ml, aproximadamente 15 μ g/ml, aproximadamente 16 μ g/ml.

Cuando el componente acuoso incluye pertactina en un antígeno de la tos ferina acelular, su concentración puede estar en el intervalo de 2 μ g/ml a 20 μ g/ml o entre 4 μ g/ml y 10 μ g/ml, por ejemplo aproximadamente 5 μ g/ml o aproximadamente 6 μ g/ml.

Cuando el componente acuoso incluye cada uno de PT, FHA y pertactina, sus proporciones en peso pueden variar, pero pueden ser, por ejemplo aproximadamente 16:16:5 o aproximadamente 5:10:6 (PT:FHA:PRN).

Cuando el componente acuoso incluye los tipos 2 y 3 de fimbrias en un antígeno de la tos ferina acelular, su concentración combinada puede estar en el intervalo de 2 μ g/ml a 20 μ g/ml o entre 5 μ g/ml y 15 μ g/ml, por ejemplo aproximadamente 10 μ g/ml.

Un componente de la tos ferina acelular útil tiene 10 μ g/ml de PT (preferentemente el mutante 9K/129G), 5 μ g/ml de FHA y 5 μ g/ml de PRN. Otro componente de la tos ferina acelular útil tiene 5 μ g/ml de PT (preferentemente el mutante 9K/129G), 2,5 μ g/ml de FHA y 2,5 μ g/ml de PRN.

Además de los antígenos D, T y Pa, el componente acuoso puede incluir un adyuvante. El adyuvante puede comprender una o más sales de aluminio, tales como hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio. El contenido de aluminio (medido como Al^{+++}) es habitualmente menor que 1,7 mg/ml, y puede ser menor que 0,84 mg/ml, por

ejemplo entre 0,4-0,8 mg/ml, entre 0,5-0,7 mg/ml, aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,6 mg/ml, aproximadamente 0,66 mg/ml, aproximadamente 0,27 mg/ml, etc.

5 Cuando la sal o sales de aluminio están presentes en el componente acuoso, los antígenos D, T y/o Pa se pueden adsorber a ellas. Por ejemplo, todos los antígenos D, T y Pa se pueden adsorber individualmente a un adyuvante de hidróxido de aluminio y a continuación mezclarse para preparar el componente acuoso. Como alternativa, todos los antígenos D, T y Pa se pueden adsorber individualmente a un adyuvante de fosfato de aluminio y a continuación mezclarse. También se pueden usar adsorción secuencial, como también adsorción a mezclas de diferentes sales de aluminio. Por lo general, los antígenos se adsorben completamente, aunque en ocasiones se puede evitar la adsorción total para el toxoide del tétanos, por ejemplo, se puede usar una adsorción entre un 0-10 % del toxoide del tétanos total.

10 Un componente de la tos ferina acelular útil con adyuvante tiene 10 µg/ml de PT (preferentemente el mutante 9K/129G), 5 µg/ml de FHA, 5 µg/ml de PRN, 2 mg/ml de hidróxido de aluminio, 9 mg/ml de cloruro sódico y 0,1 mg/ml de timerosal. Otro componente de la tos ferina acelular útil con adyuvante tiene 5 µg/ml de PT (preferentemente el mutante 9K/129G), 2,5 µg/ml de FHA, 2,5 µg/ml de PRN, 2 mg/ml de hidróxido de aluminio, 9 mg/ml de cloruro sódico y 0,1 mg/ml de timerosal.

15 Cuando se adsorben los antígenos, una composición puede ser una suspensión con un aspecto turbio, lo que significa que la contaminación microbiana puede no ser visible fácilmente. De ese modo, un componente acuoso puede contener un conservante, particularmente cuando la vacuna se envasa en recipientes de múltiples dosis. Sin embargo, es preferente no usar conservantes con mercurio (por ejemplo, timerosal), pero si no se puede evitar el mercurio entonces las composiciones deberían contener < 25 ng/ml de mercurio. Son preferentes las composiciones exentas de mercurio, y un conservante útil que no tiene mercurio es 2-fenoxietanol (2-PE). Los niveles de 2-PE menores que 10 mg/ml son habituales, por ejemplo entre 4-7 mg/ml, por ejemplo aproximadamente 5 mg/ml, o aproximadamente 6,6 mg/ml.

El componente acuoso estará habitualmente exento de sacárido o sacáridos capsulares meningocócicos.

25 Dieciséis realizaciones específicas del componente acuoso incluyen: (a) una mezcla exenta de conservante que comprende 2,5 Lf de toxoide de la difteria, 5 Lf de toxoide del tétanos, 2,5 µg de pertactina, 8 µg de FHA y 8 µg de toxoide de la tos ferina, habitualmente en un volumen de 0,5 ml; (b) una mezcla exenta de conservante que comprende 2,5 Lf de toxoide de la difteria, 5 Lf de toxoide del tétanos, 2,5 µg de pertactina, 8 µg de FHA, 8 µg de toxoide de la tos ferina, 4,5 mg de cloruro sódico y un adyuvante de hidróxido de aluminio con < 0,4 mg de Al⁺⁺⁺, por ejemplo 0,3 mg de Al⁺⁺⁺; (c) una mezcla que comprende 2,5 Lf de toxoide de la difteria, 5 Lf de toxoide del tétanos, 2,5 µg de pertactina, 8 µg de FHA, 8 µg de toxoide de la tos ferina, 4,5 mg de cloruro sódico, 2,5 mg de 2-fenoxietanol y un adyuvante de hidróxido de aluminio con < 0,6 mg de Al⁺⁺⁺; (d) una mezcla exenta de conservante que comprende 5 Lf/ml de toxoide de la difteria, 10 Lf/ml de toxoide del tétanos, 5 µg/ml de pertactina, 16 µg/ml de FHA y 16 µg/ml de toxoide de la tos ferina; (e) una mezcla exenta de conservante que comprende 5 Lf/ml de toxoide de la difteria, 10 Lf/ml de toxoide del tétanos, 5 µg/ml de pertactina, 16 µg/ml de FHA, 16 µg/ml de toxoide de la tos ferina, 9 mg/ml de cloruro sódico y un adyuvante de hidróxido de aluminio con < 0,8 mg/ml de Al⁺⁺⁺, por ejemplo 0,6 mg/ml de Al⁺⁺⁺; (f) una mezcla que comprende 5 Lf/ml de toxoide de la difteria, 10 Lf/ml de toxoide del tétanos, 5 µg/ml de pertactina, 16 µg/ml de FHA, 16 µg/ml de toxoide de la tos ferina, 9 mg/ml de cloruro sódico, 5 mg/ml de 2-fenoxietanol y un adyuvante de hidróxido de aluminio con < 1,1 mg/ml de Al⁺⁺⁺; (g) a (i) son las realizaciones (a) a (c) pero que incluyen también 40 DU de poliovirus de tipo 1, 8 DU de poliovirus de tipo 2, y 32 DU de poliovirus de tipo 3; (j) a (1) son las realizaciones (d) a (f) pero que incluyen también 80 DU/ml de poliovirus de tipo 1, 16 DU/ml de poliovirus de tipo 2, y 64 DU/ml de poliovirus de tipo 3; (m) una mezcla que comprende 2 Lf de toxoide de la difteria, 5 Lf de toxoide del tétanos, 3 µg de pertactina, 5 µg de FHA, 2,5 µg de toxoide de la tos ferina, 5 µg de los tipos 2 y 3 de fimbrias de la tos ferina, 3,3 mg de 2-fenoxietanol y un adyuvante de fosfato de aluminio con < 0,35 mg de Al⁺⁺⁺; (n) una mezcla exenta de conservante que comprende 2 Lf de toxoide de la difteria, 5 Lf de toxoide del tétanos, 3 µg de pertactina, 5 µg de FHA, 2,5 µg de toxoide de la tos ferina, 5 µg de los tipos 2 y 3 de fimbrias de la tos ferina, y un adyuvante de fosfato de aluminio con < 0,35 mg de Al⁺⁺⁺; (o) una mezcla que comprende 4 Lf/ml de toxoide de la difteria, 10 Lf/ml de toxoide del tétanos, 6 µg/ml de pertactina, 10 µg/ml de FHA, 5 µg/ml de toxoide de la tos ferina, 10 µg/ml de los tipos 2 y 3 de fimbrias de la tos ferina, 6,6 mg/ml de 2-fenoxietanol y un adyuvante de fosfato de aluminio con < 0,7 mg/ml de Al⁺⁺⁺; (p) una mezcla exenta de conservante que comprende 4 Lf/ml de toxoide de la difteria, 10 Lf/ml de toxoide del tétanos, 6 µg/ml de pertactina, 10 µg/ml de FHA, 5 µg/ml de toxoide de la tos ferina, 10 µg/ml de los tipos 2 y 3 de fimbrias de la tos ferina, y un adyuvante de fosfato de aluminio con < 0,7 mg de Al⁺⁺⁺. Siete realizaciones adicionales del componente acuoso comprenden: (a) 20 Lf/ml de toxoide del tétanos, 50 Lf/ml de toxoide de la difteria, 10 µg/ml de PT (preferentemente el mutante 9K/129G), 5 µg/ml de FHA y 5 µg/ml de PRN; (b) 10 Lf/ml de toxoide del tétanos, 25 Lf/ml de toxoide de la difteria, 5 µg/ml de PT (preferentemente el mutante 9K/129G), 2,5 µg/ml de FHA y 2,5 µg/ml de PRN; (c) 10 Lf/ml de toxoide del tétanos, 30 Lf/ml de toxoide de la difteria, 5 µg/ml de PT (preferentemente el mutante 9K/129G), 2,5 µg/ml de FHA y 2,5 µg/ml de PRN; (d) 20 Lf/ml de toxoide del tétanos, 50 Lf/ml de toxoide de la difteria, 5 µg/ml de PT (preferentemente el mutante 9K/129G), 2,5 µg/ml de FHA y 2,5 µg/ml de PRN; (e) 10 Lf/ml de toxoide del tétanos, 5 Lf/ml de toxoide de la difteria, 10 µg/ml de PT (preferentemente el mutante 9K/129G), 5 µg/ml de FHA y 5 µg/ml de PRN; (f) 10 Lf/ml de toxoide del tétanos, 4 Lf/ml de toxoide de la difteria, 5 µg/ml de PT (preferentemente el mutante 9K/129G), 2,5 µg/ml de FHA y 2,5 µg/ml de PRN; y (g) entre 5-15 Lf/ml de toxoide del tétanos, entre 2-8 Lf/ml de toxoide de la difteria, entre 1-20 µg/ml de PT

preferentemente como el mutante 9K/129G, entre 1-20 µg/ml de FHA, y 1-20 µg/ml de PRN.

Componente liofilizado (secado por congelación)

Los kits y los procedimientos de la invención usan un componente antigénico liofilizado que incluye conjugados de
sacáridos capsulares meningocócicos. La administración de los conjugados meningocócicos da como resultado
5 preferentemente una respuesta de anticuerpo bactericida, con un aumento en el título de ensayo bactericida en
suero (SBA) para el serogrupo pertinente de al menos 4 veces, y preferentemente al menos 8 veces, medido con
complemento humano [14]. Si se usa complemento de conejo para medir los títulos de SBA, entonces el aumento de
título es preferentemente al menos 128 veces.

Se han aprobado vacunas monovalentes conjugadas frente al serogrupo C para uso humano, e incluyen
10 MENJUGATE™ [15], MENINGITEC™ y NEISVAC-C™. Se conocen mezclas de conjugados de los serogrupos A+C
[16,17] y se ha informado de mezclas de conjugados de los serogrupos A+C+W135+Y [18-21] y se aprobaron en
2005 como el producto acuoso MENACTRA™. El componente liofilizado usado con la invención incluye sacáridos de
los cuatro serogrupos A, C, W135 e Y.

Los conjugados de cada serogrupo pueden estar presentes en masas básicamente iguales, por ejemplo la masa de
15 cada sacárido de serogrupo está dentro de un ± 5 % entre sí. Sin embargo, en otras realizaciones la masa de
sacárido de un serogrupo puede diferir de la masa de sacárido de otro serogrupo, por ejemplo un serogrupo puede
tener una dosis 2 x que otro serogrupo. Una cantidad habitual de sacárido por serogrupo está entre 1 µg y 20 µg, por
ejemplo entre 2 y 10 µg. Para un serogrupo individual, la masa de sacárido por dosis de vacuna (por ejemplo, por
20 volumen final de 0,5 ml) puede ser, por ejemplo, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg,
aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg.

Para composiciones que incluyen sacáridos de los serogrupos A, C, W135 e Y, algunos ejemplos de proporciones
en masa adecuadas de A:C:W135:Y son 1:1:1:1, 2:1:1:1, 1:4:1:1, 1:2:1:1 y 2:2:1:1.

El sacárido capsular del meningococo del serogrupo A es un homopolímero de *N*-acetil-D-manosamina-1-fosfato con
uniones ($\alpha 1 \rightarrow 6$), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. La acetilación en la posición C-3 puede ser de
25 un 70-95 %. Las condiciones usadas para purificar el sacárido pueden dar como resultado la des-O-acetilación (por
ejemplo, en condiciones básicas), pero es útil retener OAc en esta posición C-3. En algunas realizaciones, al menos
un 50 % (por ejemplo, al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) de los restos de manosamina en los
sacáridos del serogrupo A están O-acetilados en la posición C-3. Los grupos acetilo se pueden reemplazar con
30 grupos bloqueantes para evitar la hidrólisis [22], y tales sacáridos modificados aún son sacáridos del serogrupo A
dentro del significado de la invención.

El sacárido capsular del serogrupo C es un homopolímero de ácido siálico con uniones ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (ácido *N*-acetil
neuramínico, o "NeuNAc"). La estructura del sacárido se escribe como $\rightarrow 9$ -Neu *p* NAc 7/8 OAc-($\alpha 2 \rightarrow$). La mayoría
de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en C-7 y/o C-8 de los restos de ácido siálico, pero
aproximadamente un 15 % de los aislados clínicos carecen de estos grupos O-acetilo [23,24]. La presencia o
ausencia de grupos OAc genera epítomos únicos, y la especificidad de la unión del anticuerpo al sacárido puede
35 afectar a su actividad bactericida frente a cepas O-acetiladas (OAc-) y des-O-acetiladas (OAc+) [25-27]. Los
sacáridos del serogrupo C usados con la invención se pueden preparar a partir de cepas OAc+ u OAc-. Las vacunas
del conjugado MenC con licencia incluyen sacáridos tanto OAc- (NEISVAC-C™) como OAc+ (MENJUGATE™ y
MENINGITEC™). En algunas realizaciones, las cepas para la producción de conjugados del serogrupo C son cepas
40 OAc+, por ejemplo del serotipo 16, el serosubtipo P1,7a,1, etc. De ese modo, se pueden usar cepas OAc+ de
C:16:P1,7a,1. También son útiles las cepas OAc+ en el serosubtipo P1,1, tales como la cepa C 11.

El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades de disacárido de ácido siálico-galactosa. Al igual que el
sacárido del serogrupo C, tiene una O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [28]. La
estructura se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Gal- α -(1 \rightarrow). Los sacáridos del serogrupo W135
45 usados de acuerdo con la invención pueden tener cierto grado de O-acetilación como se observa en los sacáridos
capsulares nativos del serogrupo W135, o pueden estar parcial o totalmente des-O-acetilados en una o más
posiciones del anillo de sacárido, o pueden estar hiper-O-acetilados con respecto a los sacáridos capsulares nativos.
En algunas realizaciones, no más de un 50 % (por ejemplo, como máximo un 40 %, 30 %, 20 %, o 10 %; por
ejemplo, entre un 40 % y un 45 %) de los restos de ácido siálico en un sacárido del serogrupo W135 están O-
50 acetilados en la posición o posiciones C-7 y/o C-9.

El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto en que la unidad de repetición de
disacárido incluye glucosa en lugar de galactosa. Al igual que el serogrupo W135, tiene una O-acetilación variable en
las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [28]. La estructura del serogrupo Y se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)-
 α -(2 \rightarrow 6)-D-Glc- α -(1 \rightarrow). Los sacáridos del serogrupo Y usados de acuerdo con la invención pueden tener cierto grado
55 de O-acetilación como se observa en los sacáridos capsulares del serogrupo Y, o pueden estar parcial o totalmente
des-O-acetilados en una o más posiciones del anillo de sacárido, o pueden estar hiper-O-acetilados con respecto a
los sacáridos capsulares nativos. En algunas realizaciones, no más de un 50 % (por ejemplo, como máximo un
40 %, 30 %, 20 %, o 10 %; por ejemplo, entre un 40 % y un 45 %) de los restos de ácido siálico en un sacárido del

serogrupo Y están O-acetilados en la posición o posiciones C-7 y/o C-9.

Los restos de sacárido en los conjugados pueden comprender sacáridos de longitud completa que se preparan a partir de meningococos, y/o pueden comprender fragmentos de sacáridos de longitud completa, es decir, los sacáridos pueden ser más cortos que los sacáridos capsulares nativos observados en las bacterias. De ese modo, los sacáridos pueden estar despolimerizados, produciéndose la despolimerización durante o después de la purificación del sacárido pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de cadena de los sacáridos. Un procedimiento de despolimerización implica el uso de peróxido de hidrógeno [18]. El peróxido de hidrógeno se añade al sacárido (por ejemplo, para dar una concentración final de H₂O₂ de un 1 %), y la mezcla se incuba a continuación (por ejemplo, a aproximadamente 55 °C) hasta que se consigue la reducción de longitud de cadena deseada. Otro procedimiento de despolimerización implica hidrólisis ácida [19]. Otros procedimientos de despolimerización se conocen en la técnica. Los sacáridos usados para preparar los conjugados para su uso de acuerdo con la invención se pueden obtener mediante cualquiera de estos procedimientos de despolimerización. La despolimerización se puede usar con el fin de proporcionar una longitud de cadena óptima para inmunogenicidad y/o para reducir la longitud de cadena para manejabilidad física de los sacáridos. En algunas realizaciones, los sacáridos tienen el siguiente intervalo de grados medios de polimerización (Dp): A = 10-20; C = 12-22; W135 = 15-25; Y = 15-25. En términos de peso molecular, en lugar de Dp, los intervalos útiles son, para todos los serogrupos: < 100 kDa; 5 kDa-75 kDa; 7 kDa-50 kDa; 8 kDa-35 kDa; 12 kDa-25 kDa; 15 kDa-22 kDa.

Los sacáridos usados de acuerdo con la invención pueden estar O-acetilados con el mismo patrón de O-acetilación que se observa en los sacáridos capsulares nativos, o pueden estar parcial o totalmente des-O-acetilados en una o más posiciones de los anillos de sacárido, o pueden estar hiper-O-acetilados con respecto a los sacáridos capsulares nativos.

Algunas proteínas vehículo útiles (véase posteriormente) incluyen CRM197, toxoide de la difteria y/o toxoide del tétanos. Cuando el componente liofilizado incluye conjugados de más de un serogrupo meningocócico, entonces los diversos conjugados pueden usar diferentes proteínas vehículo (por ejemplo, un serogrupo en CRM197, otro en toxoide del tétanos) o pueden usar la misma proteína vehículo (por ejemplo, los sacáridos de dos serogrupos se conjugan por separado a CRM197 y a continuación se combinan).

Los conjugados meningocócicos adecuados se pueden preparar mediante los procedimientos que se desvelan, por ejemplo, en cualquiera de las referencias 18, 19, 29, 30, 31, 32, 33, 75, 76, 97 y/o 99, o mediante cualquier otro procedimiento adecuado.

Un componente liofilizado preferente incluye los conjugados meningocócicos de los serogrupos A, C, W135 e Y que se describen en las referencias 33 y 34.

Otro componente liofilizado útil es sin adyuvante e incluye 5 µg de sacárido capsular por cada uno de los serogrupos A, C, W135 e Y, conjugándose por separado cada sacárido de serogrupo a un vehículo de toxoide del tétanos, como se describe en la referencia 35.

Como alternativa a la purificación de sacáridos a partir de bacterias, se pueden preparar sacáridos mediante síntesis química, en su totalidad o en parte [36,37].

Por razones de estabilidad, un componente liofilizado puede incluir un estabilizador tal como lactosa, sacarosa, trehalosa o manitol, así como las mezclas de los mismos, por ejemplo mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol, etc. El uso de una mezcla de sacarosa/manitol puede acelerar el procedimiento de secado.

Un componente liofilizado también puede incluir cloruro sódico.

Los componentes solubles en el material liofilizado se retendrán en la composición después de la reconstitución. De ese modo, la vacuna combinada final puede contener uno o más estabilizadores (por ejemplo, puede incluir lactosa y/o sacarosa) y puede contener cloruro sódico.

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

El componente liofilizado estará habitualmente exento de antígeno o antígenos de la tos ferina. También estará habitualmente exento de toxoide de la difteria y toxoide del tétanos, excepto por cualquier toxoide que se haya usado como proteína vehículo durante la conjugación del conjugado o conjugados meningocócicos.

Algunas realizaciones específicas del componente liofilizado incluyen: (a) una mezcla que comprende sacáridos de los serogrupos A, C, W135 e Y, cada uno conjugado por separado a CRM197, para dar una dosis final de vacuna de 10 µg para el serogrupo A y 5 µg para los serogrupos C, W135 e Y; (b) una mezcla que comprende sacáridos de los serogrupos A, C, W135 e Y, cada uno conjugado por separado a toxoide de la difteria, para dar una dosis final de vacuna de 5 µg para cada serogrupo; (c) una mezcla que comprende sacáridos de los serogrupos A, C, W135 e Y, cada uno conjugado por separado a toxoide del tétanos, para dar una dosis final de vacuna de 2,5 µg para cada serogrupo; (d) una mezcla que comprende sacáridos de los serogrupos A, C, W135 e Y, cada uno conjugado por separado a toxoide del tétanos, para dar una dosis final de vacuna de 5 µg para cada serogrupo; (e) una mezcla que

- comprende sacáridos de los serogrupos A, C, W135 e Y, cada uno conjugado por separado a toxoide del tétanos, para dar una dosis final de vacuna de 2,5 µg para los serogrupos A, W135 e Y y 10 µg para el serogrupo C; (f) una mezcla que comprende sacáridos de los serogrupos A, C, W135 e Y, cada uno conjugado por separado a toxoide del tétanos, para dar una dosis final de vacuna de 2,5 µg para los serogrupos A, W135 e Y y 5 µg para el serogrupo C; y (g) una mezcla que comprende sacáridos de los serogrupos A, C, W135 e Y, cada uno conjugado por separado a toxoide del tétanos, para dar una dosis final de vacuna de 2,5 µg para los serogrupos W135 e Y y 5 µg para los serogrupos A y C.

Envasado de las composiciones de la invención

- Los componentes húmedos y secos usados con la invención se deben mantener separados entre sí antes de su uso. De ese modo, se envasan por separado en forma de un kit. El kit puede tener diversas formas.

- En algunas realizaciones, los dos componentes se envasan en recipientes separados. En otras realizaciones, los dos componentes se envasan en cámaras separadas de un recipiente individual, por ejemplo, en recipientes separados de una jeringa de múltiples cámaras. Una jeringa de cámara doble permite que se mantengan por separado dos composiciones individuales durante su almacenamiento, pero que se mezclen cuando se activa el émbolo de la jeringa.

El material liofilizado se presentará habitualmente en un vial cerrado herméticamente. El vial tendrá una abertura (por ejemplo, un sello de caucho, un cuello rompible, etc.) que puede mantener la esterilidad mientras permite la retirada de sus contenidos y/o la introducción de material acuoso para reconstitución. Los viales se pueden fabricar de diversos materiales, por ejemplo, de vidrio, de plástico, etc.

- El material acuoso también se puede presentar en un vial, pero como alternativa se puede presentar, por ejemplo, en una jeringa. De nuevo, el recipiente será capaz de mantener la esterilidad mientras que permita la retirada de sus contenidos. Una jeringa se puede aplicar con o sin una aguja unida a ella; en el último caso, se puede envasar una aguja separada con la jeringa para su montaje y uso, y la jeringa tendrá generalmente un tapón de punta para cerrar herméticamente la punta antes de la unión de una aguja. Son preferentes las agujas de seguridad. Son habituales agujas de calibre 23 de 2,54 cm, calibre 25 de 2,54 cm y calibre 25 de 1,56 cm. El émbolo de la jeringa puede tener un tope para evitar que el émbolo se retire accidentalmente durante la aspiración. Las jeringas se pueden fabricar de diversos materiales, por ejemplo, de vidrio, plástico, etc.

- Un vial puede tener un tapón (por ejemplo, un cierre de tipo Luer) adaptado de un modo tal que la jeringa se pueda insertar en el tapón, los contenidos de la jeringa se puedan expeler al vial (para reconstituir el material liofilizado en el mismo), y los contenidos del vial se puedan retirar de vuelta a la jeringa. Después de la retirada de la jeringa del vial, se puede acoplar a continuación una aguja y la composición se puede administrar a un paciente. El tapón se puede situar en el interior de un sello o cubierta, de un modo tal que el sello o la cubierta se tenga que retirar antes de que se pueda acceder al tapón.

- Cuando el material se envasa en un recipiente, el recipiente se esterilizará habitualmente antes de que se añada el material al mismo.

Cuando se usa un recipiente de vidrio (por ejemplo, una jeringa o un vial), entonces se puede fabricar de forma útil de vidrio de borosilicato en lugar de vidrio sodocálcico.

Reconstitución

- Antes de la administración a un paciente, la invención implica la reconstitución de un componente antigénico liofilizado (que contiene al menos un conjugado meningocócico) con un componente acuoso (que contiene al menos antígenos de D-T-Pa). La reconstitución puede implicar diversas etapas.

- Si los componentes están presentes en una jeringa de múltiples cámaras, entonces el accionamiento de la jeringa combinará los materiales acuoso y seco. Cuando los componentes están presentes en recipientes separados, se pueden usar diferentes procedimientos de mezcla. En algunas realizaciones, el material acuoso en un vial se puede extraer a una jeringa (por ejemplo, a través de una aguja), o ya puede estar presente en una jeringa. El material acuoso se puede transferir a continuación de la jeringa a un vial que contiene el material liofilizado (por ejemplo, a través de una aguja, que puede ser igual o diferente que la aguja usada previamente para extraer el material acuoso del vial). El material liofilizado se reconstituye de ese modo y se puede extraer (por ejemplo, a través de una aguja, de nuevo siendo igual o diferente que la aguja usada anteriormente) a una jeringa (por ejemplo, igual o diferente que la jeringa usada anteriormente), desde la que se puede inyectar a un paciente (por ejemplo, a través de una aguja, de nuevo siendo igual o diferente que la aguja usada anteriormente).

- Una vez se han combinado el material liofilizado y el material acuoso y están presentes en un dispositivo de suministro (por lo general una jeringa), entonces la composición se puede administrar a un paciente. La reconstitución tendrá lugar por lo general inmediatamente antes de la administración a un paciente, por ejemplo no más de 30 minutos antes de la inyección.

Después de la reconstitución, la composición para la administración a un paciente incluirá toxoide de la difteria, toxoide del tétanos, antígeno o antígenos de la tos ferina acelulares y conjugado o conjugados meningocócicos. Los antígenos de D, T y Pa tienen su origen en el material acuoso original y el conjugado meningocócico tiene su origen en el material liofilizado original. Habitualmente, el componente acuoso estará exento de sacáridos capsulares meningocócicos.

Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna

La invención implica la administración conjunta de D, T, Pa y conjugados meningocócicos en forma de una vacuna de combinación. Las composiciones reconstituidas son adecuadas para administración a pacientes humanos, y la invención se refiere al uso de las composiciones reconstituidas en un procedimiento para aumentar la respuesta inmunitaria en un paciente, que comprende la etapa de administrar al paciente una composición de la invención.

Las composiciones reconstituidas de la invención son vacunas, para su uso en la reducción o prevención de difteria, tétanos, tos ferina y meningitis. Las vacunas se usan como vacunas de refuerzo en pacientes que se han inmunizado previamente frente a (a) difteria, tétanos y tos ferina o (b) difteria, tétanos, tos ferina y meningitis meningocócica.

Los pacientes que reciben las composiciones de la invención son adolescentes con una edad entre 10 y 18 años.

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

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

Conjugación

La invención usa conjugados meningocócicos en los que se conjugan sacáridos capsulares a proteínas vehículo. Algunas proteínas vehículo útiles para conjugación covalente son toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoide de la difteria o toxoide del tétanos, o derivados de los mismos tales como el mutante de la toxina de la difteria CRM197 [38-40]. Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen la proteína de membrana exterior de *N. meningitidis* [41], péptidos sintéticos [42,43], proteínas de choque térmico [44,45], proteínas de la tos ferina [46,47], citoquinas [48], linfoquinas [48], hormonas [48], factores de crecimiento [48], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T humanos CD4⁺ de diversos antígenos derivados de patógenos [49] tales como N19 [50], proteína D de *H. influenzae* [51-53], neumolisina [54] o sus derivados no tóxicos [55], proteína de superficie neumocócica PspA [56], proteínas de captación de hierro [57], toxina A o B de *C. difficile* [58], exoproteína A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) [59], etc.

En la actualidad, el toxoide de la difteria (Dt), el toxoide del tétanos (Tt) y CRM197 son los vehículos principales en uso en vacunas pediátricas, por ejemplo los conjugados de Hib de GSK (por ejemplo, como los presentes en HIBERIX™ y INFANRIX HEXA™) usan Tt como vehículo, el producto HIBTITER™ usa CRM197, los conjugados neumocócicos de PREVENAR™ usan CRM197, los productos MENJUGATE™ y MENINGITEC™ usan CRM197, y NEISVAC-C™ usa Tt.

Se pueden usar conjugados con una proporción de sacárido:proteína (p/p) entre 1:5 (es decir, proteína en exceso) y 5:1 (es decir, sacárido en exceso), por ejemplo proporciones entre 1:2 y 5:1 y proporciones entre 1:1,25 y 1:2,5.

Se pueden usar conjugados junto con proteína vehículo libre [60], particularmente cuando el vehículo de uno o más conjugados es un toxoide de la difteria, toxoide del tétanos o antígeno de la tos ferina.

Por lo general, el sacárido se activará o se funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianación tales como CDAP (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio [61,62,etc.]). Otras técnicas adecuadas usan ésteres activos, carbodiimidas, hidrazidas, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 94). Se puede usar aminación reductora para introducir un grupo amino reactivo.

Se puede usar un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, por reemplazo de los grupos =O terminales con -NH₂) seguido de derivatización con un diéster adípico (por ejemplo, N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico) y reacción con la proteína vehículo. En otra reacción útil, se derivatiza un sacárido con un reactivo de cianación, seguido de acoplamiento a una proteína (directo, o después de la introducción de un grupo nucleófilo tiol o hidrazida en el vehículo), sin la necesidad de usar un conector. Algunos reactivos de cianación adecuados incluyen tetrafluoroborato de 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinio ("CDAP"), cianato de p-nitrofenilo y tetrafluoroborato de N-cianotrietilamonio ("CTEA").

La proteína vehículo se puede conjugar covalentemente al sacárido directamente o a través de un conector. Se conocen diversos conectores, por ejemplo un conector de ácido adípico, que se puede usar por acoplamiento de un

- grupo -NH₂ libre (por ejemplo, introducido en un sacárido mediante aminación reductora) con un ácido adípico activado (usando, por ejemplo, activación con diimida), y a continuación acoplamiento de una proteína al compuesto intermedio de sacárido-ácido adípico resultante [63,64]. Otro tipo de unión es un conector de carbonilo, que se puede formar por reacción de un grupo hidroxilo libre de un glicano modificado con CDI [65,66] seguido de reacción con una proteína para formar una unión carbamato. Otros conectores incluyen β-propionamido [67], nitrofenil-etilamina [68], haluros de haloacilo [69], uniones glicosídicas [70], ácido 6-aminocaproico [71], N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) [72], dihidrazida del ácido adípico ADH [73], restos C₄ a C₁₂ [74], etc. También se puede usar condensación con carbodiimida [75]. La unión más preferente entre un vehículo y un sacárido es a través de un conector de ácido adípico.
- 10 Los sacáridos se unirán por lo general covalentemente, ya sea directamente o a través de un conector, a un vehículo a través de un grupo -NH₂ libre en el vehículo, por ejemplo, en una cadena lateral de lisina, una cadena lateral de arginina o en N-terminal. La unión a través de -SH también es posible, por ejemplo en una cadena lateral de cisteína.
- Los conjugados de CRM197 de la invención se pueden obtener como se describe en la referencia 33.
- 15 Como se describe en la referencia 76, una mezcla puede incluir un conjugado con una unión directa de sacárido/proteína y otro conjugado con unión a través de un conector. Sin embargo, de acuerdo con la invención es preferente que cada conjugado incluya un conector.
- Después de la conjugación, se pueden separar los sacáridos libres y conjugados. Existen numerosos procedimientos adecuados para esta separación, incluyendo cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. (véanse también las referencias 77 y 78, etc.). Si una vacuna comprende un sacárido dado tanto en forma libre como conjugado, la forma sin conjugar es, de forma útil, no más de un 20 % en peso de la cantidad total de ese sacárido en la composición en su conjunto (por ejemplo ≤ 15 %, ≤ 10 %, ≤ 5 %, ≤ 2 %, ≤ 1 %).
- 20 La cantidad de vehículo (conjugado y sin conjugar) de cada conjugado puede ser no más de 100 µg/ml, por ejemplo < 30 µg/ml de proteína vehículo de cada conjugado. Algunas composiciones incluyen una concentración total de vehículo menor que 500 µg/ml, por ejemplo < 400 µg/ml, < 300 µg/ml, < 200 µg/ml, < 100 µg/ml, < 50 µg/ml, etc.
- 25 **Características de las composiciones de la invención**
- Además de los componentes antigénicos descritos anteriormente, las composiciones de la invención (tanto antes como después de mezclarse) incluirán generalmente un componente no antigénico. El componente no antigénico puede incluir vehículos, adyuvantes, excipientes, tampones, etc., como se describe con mayor detalle posteriormente.
- 30 Las composiciones de la invención incluirán habitualmente uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticos. La solución salina fisiológica tamponada con fosfato exenta de pirógenos estéril es un vehículo habitual. Una discusión minuciosa de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 79.
- Para controlar la tonicidad, es útil incluir una sal fisiológica, tal como una sal sódica. El cloruro sódico (NaCl) es una de tales sales, que puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml.
- 35 Las composiciones acuosas (antes y/o después de reconstitución del material liofilizado) tendrán generalmente una osmolalidad entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, por ejemplo entre 240-360 mOsm/kg, o dentro del intervalo de 290-320 mOsm/kg.
- Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más tampones. Algunos tampones habituales incluyen: un tampón de fosfato; un tampón de Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina; o un tampón de citrato. Los tampones se incluirán por lo general en el intervalo de 5-20 mM. Tales tampones se pueden incluir en los componentes acuoso y/o liofilizado.
- 40 El pH de una composición acuosa estará generalmente entre 5,0 y 7,5, y más habitualmente entre 5,0 y 6,0 para una estabilidad óptima, o entre 6,0 y 7,0.
- Las composiciones de la invención son preferentemente estériles.
- 45 Las composiciones de la invención son preferentemente no pirogénicas conteniendo, por ejemplo, < 1 EU (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis, y preferentemente < 0,1 EU por dosis.
- Las composiciones de la invención pueden estar exentas de gluten.
- Las composiciones de la invención se pueden administrar a pacientes en dosis de 0,5 ml. Se entenderá que las referencias a dosis de 0,5 ml incluyen la varianza normal, por ejemplo 0,5 ml ± 0,05 ml. De ese modo, un componente acuoso usado con la invención puede tener un volumen de 0,5 ml.
- 50

Adyuvantes

Las composiciones de la invención pueden incluir un adyuvante, y este adyuvante puede comprender una o más sales de aluminio, y particularmente un adyuvante de fosfato de aluminio y/o un adyuvante de hidróxido de aluminio. Los componentes antigénicos usados para preparar las composiciones de la invención pueden incluir adyuvantes de aluminio antes de usarse, es decir, están "premezclados" o "preadsorbidos" en el adyuvante o adyuvantes.

En la actualidad, los adyuvantes de aluminio en uso se denominan por lo general adyuvantes de "hidróxido de aluminio" o de "fosfato de aluminio". Sin embargo, estos son nombres dados por conveniencia, ya que ninguno de los dos es una descripción precisa de la composición química real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 80). La invención puede usar cualquiera de las sales de "hidróxido" o "fosfato" que se usan en general como adyuvantes.

Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son por lo general sales de oxihidróxido de aluminio, que son habitualmente al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que se puede representar mediante la fórmula $\text{AlO}(\text{OH})$, se puede distinguir de otros componentes de aluminio, tales como hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$, mediante espectroscopía infrarroja (IR), en particular mediante la presencia de una banda de absorción a 1070 cm^{-1} y un hombro fuerte a $3090\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ (capítulo 9 de la referencia 80).

Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son por lo general hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo también contienen una pequeña cantidad de sulfato. Se pueden obtener por precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación pueden influir en el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos tienen por lo general una proporción molar de PO_4/Al entre 0,3 y 0,99. Los hidroxifosfatos se pueden distinguir del AlPO_4 estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda del espectro IR a 3164 cm^{-1} (por ejemplo cuando se calienta a $200\text{ }^\circ\text{C}$) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de la referencia 80).

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

El PZC del fosfato de aluminio es inversamente proporcional al grado de sustitución de fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y la concentración de reactivos usadas para preparar la sal por precipitación. El PZC también se altera por cambio de la concentración de los iones fosfato libres en solución (más fosfato = PZC más ácido) o por adición de un tampón tal como un tampón de histidina (hace el PZC más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención tendrán generalmente un PZC entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5 por ejemplo aproximadamente 5,7.

Una solución de fosfato de aluminio usada para preparar una composición de la invención puede contener un tampón (por ejemplo, un tampón de fosfato o de histidina o de Tris), pero esto no siempre es necesario. La solución de fosfato de aluminio es preferentemente estéril y exenta de pirógenos. La solución de fosfato de aluminio puede incluir iones fosfato acuosos libres, por ejemplo presentes en una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferentemente entre 5 y 15 mM, y más preferentemente aproximadamente 10 mM. La solución de fosfato de aluminio también puede comprender cloruro sódico. La concentración de cloruro sódico está preferentemente en el intervalo de 0,1 a 100 mg/ml (por ejemplo 0,5-50 mg/ml, 1-20 mg/ml, 2-10 mg/ml) y es más preferentemente aproximadamente 361 mg/ml. La presencia de NaCl facilita la medida correcta de pH antes de la adsorción de antígenos.

Antígenos adicionales que se pueden incluir

Además de incluir antígenos de D, T, Pa y de sacáridos de *N. meningitidis* conjugados, las composiciones pueden incluir uno o más antígenos adicionales. Por ejemplo, pueden incluir antígenos de otros patógenos, particularmente de bacterias y/o virus. Algunos antígenos adicionales adecuados se pueden seleccionar entre:

- antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (VHB) ("HBsAg");
- vacuna de poliovirus inactivada (IPV);
- sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo B;
- sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*;
- antígeno del virus de la hepatitis A (VHA).

Estos antígenos pueden tener su origen en el componente acuoso o liofilizado de la invención.

Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

El virus de la hepatitis B (VHB) es uno de los agentes conocidos que causa hepatitis viral. El virión del VHB consiste en un núcleo interior rodeado por un revestimiento proteico exterior o cápside, y el núcleo viral contiene el genoma

de ADN viral. El componente principal de la cápside es una proteína conocida como antígeno de superficie del VHB o, más habitualmente, "HBsAg", que es por lo general un polipéptido de 226 aminoácidos con un peso molecular de ~24 kDa. Todas las vacunas existentes de hepatitis B contienen HBsAg, y cuando este antígeno se administra a un individuo vacunado normal estimula la producción de anticuerpos anti-HBsAg que protegen frente a la infección del VHB.

Para la fabricación de la vacuna, se produce HBsAg de dos formas. El primer procedimiento implica purificar el antígeno en forma de partículas a partir del plasma de portadores de hepatitis B crónicos, ya que se sintetizan grandes cantidades de HBsAg en el hígado y se liberan al torrente sanguíneo durante la infección por VHB. La segunda vía implica expresar la proteína mediante procedimientos de ADN recombinante. El HBsAg para el uso con el procedimiento de la invención se expresa preferentemente de forma recombinante en células de levadura. Tales levaduras incluyen, por ejemplo, hospedadores de *Saccharomyces* (tal como *S. cerevisiae*) o *Hanensula* (tal como *H. polymorpha*).

El HBsAg está habitualmente sin glicosilar. A diferencia del HBsAg nativo (es decir, como producto purificado de plasma), el HBsAg expresado en levadura está generalmente sin glicosilar, y esta es la forma más preferente de HBsAg para su uso con la invención, debido a que es altamente inmunogénico y se puede preparar sin el riesgo de contaminación del producto sanguíneo.

El HBsAg estará generalmente en forma de partículas básicamente esféricas (diámetro medio de aproximadamente 20 nm), que incluyen una matriz lipídica que contiene fosfolípidos. Las partículas de HBsAg expresadas en levadura pueden incluir fosfatidilinositol, que no se encuentra en los viriones naturales del VHB. Las partículas también pueden incluir una cantidad no tóxica de LPS con el fin de estimular el sistema inmune [81]. El HBsAg puede estar en forma de partículas que incluyen una matriz lipídica que contiene fosfolípidos, fosfatidilinositol y polisorbato 20.

Todos los subtipos de VHB conocidos contienen el determinante común "a". Combinado con otros determinantes y subdeterminantes, se han identificado nueve subtipos: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq- y adrq+. Además de estos subtipos, han surgido otras variantes, tales como mutantes del VHB que se han detectado en individuos inmunizados ("mutantes de escape"). El subtipo habitual de VHB de acuerdo con la invención es el subtipo adw2.

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

Las cantidades de HBsAg se expresan por lo general en microgramos, y una cantidad habitual de HBsAg por dosis de vacuna está entre 5 y 25 µg, por ejemplo 10 µg/dosis.

Aunque el HBsAg se puede adsorber en un adyuvante de hidróxido de aluminio en la vacuna final (como en el producto bien conocido *ENGERIX-B™*), o puede permanecer sin adsorber, generalmente se adsorberá en un adyuvante de fosfato de aluminio [82].

Cuando se usa con la invención, HBsAg estará por lo general en el componente acuoso.

35 Vacuna de poliovirus inactivada

El poliovirus causa la poliomielitis. En lugar de usar la vacuna de poliovirus oral, la invención puede usar IPV, como se desvela con mayor detalle en el capítulo 24 de la referencia 1.

Los poliovirus se pueden cultivar en cultivo celular, y un cultivo preferente usa una línea celular Vero, obtenida a partir de riñón de mono. Las células Vero se pueden cultivar convenientemente sobre microvehículos. Después del crecimiento, los viriones se pueden purificar usando técnicas tales como ultrafiltración, diafiltración, y cromatografía. Antes de la administración a los pacientes, los poliovirus se deben inactivar, y esto se puede conseguir por tratamiento con formaldehído.

La poliomielitis puede estar causada por uno de tres tipos de poliovirus. Los tres tipos son similares y causan síntomas idénticos, pero son antigénicamente muy diferentes y la infección con un tipo no protege frente a la infección con los demás. Por lo tanto, es preferente usar tres antígenos de poliovirus en la invención: poliovirus de Tipo 1 (por ejemplo, la cepa Mahoney), poliovirus de Tipo 2 (por ejemplo, la cepa MEF-1), y poliovirus de Tipo 3 (por ejemplo, la cepa Saukett). También se pueden usar cepas Sabin (véanse, por ejemplo, las referencias 83 y 84). Preferentemente, los virus se cultivan, se purifican y se inactivan individualmente, y a continuación se combinan para dar una mezcla trivalente a granel para su uso con la invención.

Las cantidades de IPV se expresan por lo general en la unidad "DU" ("unidad de antígeno D" [85]). Es habitual incluir entre 1-100 DU por tipo viral por dosis, por ejemplo aproximadamente 80 DU/ml de poliovirus de tipo 1, aproximadamente 16 DU/ml de poliovirus de tipo 2, y aproximadamente 64 DU/ml de poliovirus de tipo 3. Sin embargo, también se pueden usar dosis inferiores, como se desvela en la referencia 86.

Preferentemente, los antígenos de poliovirus no están adsorbidos en ningún adyuvante de sal de aluminio antes de

usarse para fabricar las composiciones de la invención, pero pueden conseguir adsorberse sobre el adyuvante o adyuvantes de aluminio en la composición de vacuna durante el almacenamiento.

Cuando se usa con la invención, IPV estará por lo general en el componente acuoso.

Sacáridos de Hib

5 El antígeno de sacárido capsular de *H. influenzae* de tipo B ("Hib") se conoce bien [por ejemplo, capítulo 14 de la referencia 1] y su preparación está bien documentada [por ejemplo, referencias 87 a 96]. El sacárido de Hib se conjuga a una proteína vehículo con el fin de mejorar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La invención puede usar cualquier conjugado de Hib adecuado.

10 El resto de sacárido del conjugado de Hib puede ser un polisacárido (por ejemplo, fosfato de polirribosilribitol (PRP) de longitud completa), pero también es posible usar oligosacáridos (por ejemplo, MW de ~1 a ~5 kDa). Los oligosacáridos se forman convenientemente por fragmentación de PRP purificado (por ejemplo, mediante hidrólisis), lo que habitualmente irá seguido de purificación de los fragmentos del tamaño deseado. Cuando la composición de la invención incluye un oligosacárido conjugado, la preparación de los oligosacáridos debería preceder a la conjugación.

15 La concentración del conjugado de Hib en las composiciones de la invención estará habitualmente en el intervalo de 0,5 µg/ml a 50 µg/ml, por ejemplo de 1 µg/ml a 20 µg/ml, de 12 µg/ml a 16 µg/ml, etc. La concentración puede ser aproximadamente 15 µg/ml o aproximadamente 12,5 µg/ml en algunas realizaciones. Una masa menor de 5 µg por dosis puede ser adecuada [97], por ejemplo en el intervalo de 1-5 µg, 2-4 µg, o aproximadamente 2,5 µg. Como se describe posteriormente, la dosis de sacárido de Hib se puede seleccionar basándose en la dosis del sacárido meningocócico (en particular, con múltiples serogrupos meningocócicos, su masa media). Las características adicionales de los conjugados de Hib son como se ha desvelado anteriormente para los conjugados meningocócicos, incluyendo la selección de la proteína vehículo (por ejemplo, CRM197 o toxoide del tétanos), uniones, proporciones, etc.

20 Un conjugado de Hib puede estar adsorbido en una sal de aluminio o puede estar sin adsorber. Se ha informado que la adsorción en adyuvantes de fosfato de aluminio es ventajosa en algunas circunstancias [98], mientras que se ha informado que la no adsorción es ventajosa en otras circunstancias [3]. Estas posibilidades se pueden investigar fácilmente y comparar para cualquier combinación particular.

25 Se conocen diversos conjugados de Hib diferentes. Por ejemplo, la Tabla 14-7 de la referencia 1 da las características de cuatro conjugados de Hib diferentes. Estos difieren en diversos parámetros, por ejemplo la proteína vehículo. La invención puede usar cualquier proteína vehículo adecuada (véase posteriormente), tal como CRM197 (como en "HbOC"), toxoide del tétanos (como en "PRP-T") y el complejo de membrana exterior de *N. meningitidis* (como en "PRP-OMP").

30 Cuando una composición de la invención incluye sacáridos de más de un serogrupo meningocócico, existe una masa media de sacárido por serogrupo. Si se usan masas básicamente iguales de cada serogrupo entonces la masa media será la misma que cada masa individual; cuando no se usan masas iguales entonces la media diferirá, por ejemplo con una cantidad de 10:5:5 µg para una mezcla MenACWY, la masa media es 6,25 µg por serogrupo. Si también se incluye un sacárido de Hib entonces, en algunas realizaciones, su masa será básicamente la misma que la masa media de sacárido meningocócico por serogrupo. En algunas realizaciones, la masa de sacárido de Hib será mayor (por ejemplo, al menos 1,5 x) que la masa media de sacárido meningocócico por serogrupo. En algunas realizaciones, la masa de sacárido de Hib será menor (por ejemplo, en al menos 1,5 x) que la masa media de sacárido meningocócico por serogrupo [99].

35 Cuando se usa con la invención, un conjugado de Hib puede estar en el componente acuoso o en el componente liofilizado. A menudo estará en el componente liofilizado.

Sacáridos neumocócicos

45 Los antígenos neumocócicos conjugados comprenden antígenos de sacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* conjugados a proteínas vehículo [por ejemplo, referencias 100 a 102]. Es normal incluir sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*: se usan ampliamente mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes, como son las vacunas de conjugado con polisacáridos entre 5 y 11 serotipos diferentes [103]. Por ejemplo, PREVNAR™ [104] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F) con cada sacárido conjugado individualmente a CRM197 mediante aminación reductora, con 2 µg de cada sacárido por dosis de 0,5 ml (4 µg de serotipo 6B).

50 Las composiciones de la invención pueden incluir antígenos de sacárido para al menos los serotipos 6B, 14, 19F y 23F. Se pueden seleccionar serotipos adicionales entre: 1, 3, 4, 5, 7F, 9V y 18C. Es particularmente útil una cubierta 7-valente (como en PREVNAR™), 9-valente (por ejemplo, los 7 serotipos de PREVNAR, más 1 y 5), 10-valente (por ejemplo, los 7 serotipos de PREVNAR, más 1, 5 y 7F) y 11-valente (por ejemplo, los 7 serotipos de PREVNAR, más 1, 3, 5 y 7F) de serotipos neumocócicos. Es ventajosa una combinación 13-valente de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A,

6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

5 Las características adicionales de los conjugados neumocócicos son como se han desvelado anteriormente para los conjugados meningocócicos, incluyendo la selección de la proteína vehículo (por ejemplo, CRM197 o toxoide del tétanos), uniones, proporciones, etc. Cuando una composición incluye más de un conjugado, cada conjugado puede usar la misma proteína vehículo o una proteína vehículo diferente. La referencia 105 describe posibles ventajas cuando se usan proteínas vehículo diferentes en vacunas de conjugado neumocócico multivalentes.

Por lo general, una composición incluirá entre 1 µg y 20 µg (medidos como sacárido) por dosis de cada serotipo que esté presente.

10 Cuando se usan con la invención, el conjugado o los conjugados neumocócicos pueden estar en el componente acuoso o en el componente liofilizado.

Antígenos del virus de la hepatitis A

15 El virus de la hepatitis A (VHA) es uno de los agentes conocidos que causan hepatitis viral. Se desvelan vacunas de VHA en el capítulo 15 de la referencia 1. Un componente de VHA útil se basa en virus inactivado, y la inactivación se puede conseguir mediante tratamiento con formalina. Se puede cultivar el virus en fibroblastos diploides de pulmón embrionario humano, tales como células MRC-5. Una cepa de VHA útil es HM175, aunque también se puede usar CR326F. Las células se pueden cultivar en condiciones que permitan el crecimiento viral. Las células se lisan, y la suspensión resultante se puede purificar mediante ultrafiltración y cromatografía de permeación en gel.

La cantidad de antígeno de VHA, medida en UE (Unidades de Elisa), es por lo general al menos aproximadamente 500 UE/ml.

20 **General**

La expresión "que comprende" incluye "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

25 La palabra "básicamente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "básicamente exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, la palabra "básicamente" se puede omitir de la definición de la invención.

El término "aproximadamente", con respecto a un valor numérico x, es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

30 A menos que se indique específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezcla de dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. De ese modo, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, entonces dos componentes se pueden combinar entre sí, y a continuación la combinación se puede combinar con el tercer componente, etc.

Las concentraciones de conjugados se definen en el presente documento en términos de masa de sacárido, con el fin de evitar la variación debido a la selección de vehículo.

35 Cuando se describe que un antígeno está "adsorbido" en un adyuvante, es preferente que al menos un 50 % (en peso) de ese antígeno esté adsorbido, por ejemplo un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o más. Es preferente que el toxoide de la difteria y el toxoide del tétanos estén ambos totalmente adsorbidos, es decir, no sea detectable ninguna cantidad en el sobrenadante. También es preferente la adsorción total del HBsAg.

Cuando se usan materiales de animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, se deberían obtener de fuentes que estén exentas de encefalopatías espongiiformes transmisibles (TSE), y en particular exentos de encefalopatía espongiiforme bovina (BSE).

40 **Modos de realizar la invención**

Los sacáridos capsulares se purifican de meningococos de los serogrupos A, C, W135 e Y siguiendo los procedimientos que se desvelan en las referencias 19 y 33. Se conjugan a CRM197 siguiendo los procedimientos que se desvelan en las referencias 19 y 33. En realizaciones alternativas se conjugan a toxoide del tétanos.

45 Los conjugados se mezclan y a continuación se liofilizan para dar cantidades finales por dosis de 12 µg de MenA y 6 µg de cada uno de MenC, MenW135 y MenY. Se incluye sacarosa a 30 mg/dosis para estabilización.

50 Los contenidos total y libre de sacáridos de cada uno de los conjugados CRM-MenA, CRM-MenC, CRM-MenY y CRM-MenW se confirmaron usando cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento acoplada a detección amperimétrica pulsada (HPAEC-PAD) y mediante procedimientos colorimétricos. La distribución de tamaño molecular se determinó usando cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a PAD y electroforesis de zona capilar (CZE), para monitorizar la integridad de estos conjugados después de la liofilización. Los resultados indicaron que la liofilización no tuvo ningún impacto negativo en el contenido de sacáridos o la distribución de peso molecular

de los glicoconjugados cuando se compara con los conjugados preliofilizados.

También se usó RMN para analizar la identidad y estabilidad de los conjugados, ambos en masas monovalentes y también en la mezcla combinada final (después de la reconstitución en forma acuosa). Dado que cada combinación liofilizada contiene un gran exceso de sacarosa, las muestras se dializaron a 4 °C durante 48 horas con cuatro cambios de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,2 para retirar la sacarosa.

Se desarrolló un ensayo de identidad seleccionando una ventana restringida de 0,7 ppm (desde el valor campo abajo a 5,6 ppm al valor campo arriba a 4,9 ppm) donde se detectaron y asignaron las señales del protón anomérico de los conjugados meningocócicos. Seleccionando una región espectral restringida, el ensayo fue muy sencillo pero pudo identificar todos los antígenos de polisacárido conjugado de la vacuna combinada, detectando dos señales para MenA y una señal para cada uno de MenC, MenW135 y MenY.

El liofilizado de conjugado 4-valente combinado se reconstituye con una vacuna acuosa tal como BOOSTRIX™, KINRIX™ o ADACEL™.

En diferentes experimentos, se administró vacuna conjugada MenACWY 4-valente meningocócica cuadrivalente con vehículo CRM197 a adolescentes al mismo tiempo que BOOSTRIX™. En este estudio de Fase III de centro individual, 1620 sujetos de 11-18 años de edad, recibieron la vacuna meningocócica 4-valente al mismo tiempo que BOOSTRIX™. Se determinaron las actividades bactericidas en suero (SBA) específicas de serogrupo meningocócico, y anticuerpos frente a antígenos Tdap, antes y 1 mes después de las respectivas vacunaciones. Las proporciones de los sujetos con títulos de SBA \geq 1:8 para todos los serogrupos (A, C, W-135, Y) no fueron inferiores en comparación con los pacientes que recibieron la vacuna de conjugado Men-ACWY sola. Las respuestas inmunes a los antígenos de BOOSTRIX™ fueron comparables a las conseguidas cuando la vacuna se dio sola, aunque los aumentos en los títulos de anti-FHA y anti-PRN fueron menores. Hubo un aumento notable en las respuestas anti-difteria cuando las vacunas se administraron al mismo tiempo, probablemente debido a la presencia de CRM197 en el componente de conjugado meningocócico.

Se ha de entender que la invención se ha descrito únicamente a modo de ejemplo, y que se pueden realizar modificaciones mientras se permanece dentro del ámbito de las reivindicaciones anexas.

Referencias

- [1] Vaccines. (eds. Plotkin y Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [2] Patente WO2006/097851.
- [3] Patente WO02/00249.
- [4] Patente WO02/080965.
- [5] Patente WO2006/075170.
- [6] Minh y col. (1999) Pediatrics 104:70-76.
- [7] Theeten y col. (2005) Vaccine 23:1515-21.
- [8] Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9:232-238.
- [9] Nencioni y col. (1991) Infect Immun. 59(2): 625-30.
- [10] Módulo 1 de *The immunological basis for immunization series* de la OMS (Galazka).
- [11] Código NIBSC: 69/017.
- [12] Código NIBSC: DIFT.
- [13] Código NIBSC: TEFT.
- [14] W.H.O. Tech. Rep. Ser. 594:51, 1976.
- [15] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2:47-49.
- [16] Costantino y col. (1992) Vaccine 10:691-8.
- [17] Lieberman y col. (1996) JAMA 275:1499-503.
- [18] Patente WO02/058737.
- [19] Patente WO03/007985.
- [20] Rennels y col. (2002) Pediatr Infect Dis J 21:978-979.
- [21] Campbell y col. (2002) J Infect Dis 186:1848-1851.
- [22] Patente WO03/080678.
- [23] Glode y col. (1979) J Infect Dis 139:52-56
- [24] Patente WO94/05325; patente de Estados Unidos 5.425.946.
- [25] Arakere y Frasc (1991) Infect. Immun. 59:4349-4356.
- [26] Michon y col. (2000) Dev. Biol. 103:151-160.
- [27] Rubinstein y Stein (1998) J. Immunol. 141:4357-4362.
- [28] Patente WO2005/033148.
- [29] Patente WO2007/000314.
- [30] Patente WO2007/000341.
- [31] Patente WO02008/011201.
- [32] Patente WO2004/067030.
- [33] Bardotti y col. (2008) Vaccine 26:2284-96.
- [34] Broker y col. (2009) Vaccine 27:5574-80.

- [35] Knuf y col. (2009) Vaccine doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.064.
 [36] Pozsgay (2008) Curr Top Med Chem 8 :126-140.
 [37] Berkin y col. (2002) Chemistry 8:4424-33.
 [38] Anónimo (enero de 2002) Research Disclosure, 453077.
 5 [39] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.
 [40] Anderson y col. (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.
 [41] Patente EP-A-0372501.
 [42] Patente EP-A-0378881.
 [43] Patente EP-A-0427347.
 10 [44] Patente WO93/17712
 [45] Patente WO94/03208.
 [46] Patente WO98/58668.
 [47] Patente EP-A-0471177.
 [48] Patente WO91/01146
 15 [49] Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
 [50] Baraldo y col. (2004) Infect Immun 72(8):4884-7.
 [51] Patente EP-A-0594610.
 [52] Ruan y col. (1990) J Immunol 145:3379-3384.
 [53] Patente WO00/56360.
 20 [54] Kuo y col. (1995) Infect Immun 63:2706-13.
 [55] Michon y col. (1998) Vaccine. 16:1732-41.
 [56] Patente WO02/091998.
 [57] Patente WO01/72337
 [58] Patente WO00/61761.
 25 [59] Patente WO00/33882
 [60] Patente WO96/40242
 [61] Lees y col. (1996) Vaccine 14:190-198.
 [62] Patente WO95/08348.
 [63] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
 30 [64] Patente EP-A-0208375
 [65] Bethell G.S. y col., J Biol. Chem., 1979, 254, 2572-4
 [66] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18
 [67] Patente WO00/10599
 [68] Gevert y col., Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
 35 [69] Patente de Estados Unidos 4.057.685.
 [70] Patentes de Estados Unidos 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
 [71] Patente de Estados Unidos 4.459.286.
 [72] Patente de Estados Unidos 5.204.098
 [73] Patente de Estados Unidos 4.965.338
 40 [74] Patente de Estados Unidos 4.663.160.
 [75] Patente WO2007/000343.
 [76] Patente WO2007/000342.
 [77] Lei y col. (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264.
 [78] Patente WO00/38711; patente de Estados Unidos 6.146.902.
 45 [79] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 [80] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 [81] Vanlandschoot y col. (2005) J Gen Virol 86:323-31.
 [82] Patente WO93/24148.
 50 [83] Patente WO2007/007344.
 [84] Patente WO2008/044611.
 [85] Módulo 6 de *The immunological basis for immunization series* de la OMS (Robertson)
 [86] Patente WO2008/028957.
 [87] Ramsay y col. (2001) Lancet 357(9251):195-6.
 55 [88] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36.
 [89] Buttery y Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-168.
 [90] Ahmad y Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii.
 [91] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567.
 [92] Patente europea 0477508.
 60 [93] Patente de Estados Unidos 5.306.492.
 [94] Patente WO98/42721.
 [95] Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114.
 [96] Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 o 012342335X.
 [97] Patente WO2007/000327.
 65 [98] Patente WO97/00697.
 [99] Patente WO2007/000322.

- 5
- [100] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
 - [101] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
 - [102] Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
 - [103] Zielen y col. (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.
 - [104] Darkes y Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
 - [105] Patente WO2007/071707

REIVINDICACIONES

1. Un kit para su uso en el refuerzo de la respuesta inmunitaria de un paciente con una edad entre 10 y 18 años que se ha inmunizado previamente frente a (a) difteria, tétanos y tos ferina o (b) difteria, tétanos, tos ferina y meningitis meningocócica, que comprende: (i) un componente acuoso, que comprende una mezcla de toxoide de la difteria, toxoide del tétanos y antígenos de la tos ferina acelulares, en el que la concentración de toxoide de la difteria es < 10 Lf/ml y en el que el contenido de toxoide de la difteria medido en unidades Lf es menor que el contenido de toxoide del tétanos medido en unidades Lf; y (ii) un componente liofilizado, que comprende sacáridos capsulares conjugados de los serogrupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*, en el que el componente acuoso y el componente liofilizado se han de combinar para administración para dar una vacuna líquida combinada que es adecuada para inyección.
2. El kit para el uso de la reivindicación 1, en el que la concentración de toxoide del tétanos es < 15 Lf/ml.
3. El kit para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el componente acuoso incluye un adyuvante, en el que opcionalmente el adyuvante comprende una o más sales de aluminio, en el que opcionalmente la concentración de aluminio es menor de 0,84 mg/ml.
4. El kit para el uso de cualquier reivindicación precedente, en el que:
- la concentración de toxoide de la difteria en el componente acuoso es 4 Lf/ml o 5 Lf/ml;
 - la concentración de toxoide del tétanos en el componente acuoso es 10 Lf/ml;
 - la proporción de toxoide de la difteria con respecto a toxoide del tétanos en el componente acuoso es 1:2 o 1:2,5, medida en unidades Lf.
5. El kit para el uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el antígeno de la tos ferina acelular en el componente acuoso comprende toxina de la tos ferina ("PT") inactivada, hemaglutinina filamentosa ("FHA") y pertactina; en el que opcionalmente
- la concentración de PT en el componente acuoso es menor de 25 µg/ml;
 - la concentración de toxoide de la tos ferina en el componente acuoso es 5 µg/ml o 16 µg/ml;
 - la concentración de FHA en el componente acuoso es 10 µg/ml o 16 µg/ml;
 - la concentración de pertactina en el componente acuoso es 5 µg/ml o 6 µg/ml; o
 - las proporciones en peso de PT:FHA:pertactina son 16:16:5 o 5:10:6.
6. El kit para el uso de la reivindicación 4 o 5, en el que el toxoide de la difteria, el toxoide del tétanos y los antígenos de la tos ferina acelulares en el componente acuoso están adsorbidos en hidróxido de aluminio o en fosfato de aluminio.
7. El kit para el uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente acuoso está exento de conservantes o exento de sacáridos capsulares meningocócicos.
8. El kit para el uso de cualquier reivindicación precedente, en el que la proporción en masa de sacáridos de los serogrupos A, C, W135 e Y es 1:1:1:1, 2:1:1:1, 1:4:1:1, 1:2:1:1 o 2:2:1:1 (A:C:W135:Y).
9. El kit para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la masa de sacárido capsular por dosis de vacuna es 2,5 µg/serogrupo, 4 µg/serogrupo, 5 µg/serogrupo o 10 µg/serogrupo, y en el que la masa de cada serogrupo puede ser igual o diferente.
10. El kit para el uso de cualquier reivindicación precedente, en el que al menos un conjugado meningocócico en el componente liofilizado tiene
- una proteína vehículo CRM197, en el que opcionalmente todos los conjugados meningocócicos en el componente liofilizado tienen una proteína vehículo CRM197; o
 - una proteína vehículo toxoide del tétanos, en el que opcionalmente todos los conjugados meningocócicos en el componente liofilizado tienen una proteína vehículo toxoide del tétanos.
11. El kit para el uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente liofilizado incluye
- un estabilizador de liofilización, en el que opcionalmente el estabilizador de liofilización comprende lactosa, sacarosa, trehalosa o manitol; o
 - cloruro sódico y/o un adyuvante.
12. El kit para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el componente liofilizado está exento de adyuvante o en el que el componente liofilizado está exento de antígeno o antígenos de la tos ferina.
13. El kit para el uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente acuoso incluye una vacuna de poliovirus inactivada (IPV).

14. El kit para el uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente liofilizado incluye un sacárido capsular conjugado de *Haemophilus influenza*, en el que opcionalmente el sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* está presente con una masa de 5 µg o 10 µg por cada ml de componente acuoso.

5 15. Vacuna líquida combinada para su uso en el refuerzo de la respuesta inmunitaria de un paciente con una edad entre 10 y 18 años que ha sido inmunizado previamente frente a (a) difteria, tétanos y tos ferina o (b) difteria, tétanos, tos ferina y meningitis meningocócica que comprende toxoide de la difteria, toxoide del tétanos y antígenos de la tos ferina acelulares y sacáridos capsulares conjugados de los serogrupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*, en la que la concentración de toxoide de la difteria es < 10 Lf/ml y el contenido de toxoide de la difteria medido en unidades Lf es menor que el contenido de toxoide del tétanos medido en unidades Lf y en la que la vacuna incluye uno o más estabilizadores de liofilización.

10 16. La vacuna combinada para el uso de la reivindicación 15, en la que la concentración de toxoide del tétanos es < 15 Lf/ml.