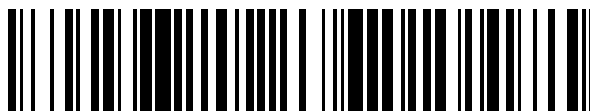


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 759**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2006 PCT/EP2006/069977**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2007 WO07071710**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2006 E 06830744 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 1973564**

54 Título: **Vacuna que comprende conjugados de polisacáridos capsulares de Streptococcus pneumoniae**

30 Prioridad:

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.08.2017**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)**  
**RUE DE L'INSTITUT, 89**  
**1330 RIXENSART, BE**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 630 759 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 polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*

**Campo de la invención**

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

**5 Antecedentes de la invención**

Los niños menores de 2 años no desarrollan una respuesta inmunitaria contra la mayoría de vacunas polisacáridicas, por lo que ha sido necesario hacer que los polisacáridos se vuelvan inmunogénicos 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 que incluye un cambio de isótopo, maduración de afinidad, e inducción de memoria.

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

El efecto de la dosificación del vehículo proteico sobre la respuesta humoral a la proteína misma se ha probado también que es multifacético. En niños humanos se ha informado que el aumento de un conjugado con toxoide tetánico tetravalente resultaba en una disminución de la respuesta al vehículo tetánico (Dagan y col., supra). Los análisis clásicos de estos efectos de la combinación de vacunas se han descrito como supresión epitópica inducida por vehículo, que no se entiende completamente, pero que se cree que resulta de una cantidad excesiva de vehículo proteico (Fattom, Vaccine 17: 126 (1999)). Esto parece que da como resultado la competición con 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 el auxilio necesario para los linfocitos B específicos del polisacárido. Sin embargo, los efectos inmunológicos no han sido consistentes, aumentando en algunos casos la respuesta inmunitaria con la cantidad total de vehículo proteico, y en otros casos disminuyendo la respuesta inmunitaria.

Por lo tanto se mantienen dificultades técnicas en la combinación de conjugados de múltiples polisacáridos en una única formulación vacunal eficaz.

El *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria Gram-positiva responsable de considerable morbilidad y mortalidad (en particular en jóvenes y ancianos), que produce enfermedades invasivas tales como neumonía, bacteriemia y meningitis, y enfermedades asociadas con la colonización, tal como otitis media aguda. La tasa de neumonía neumocócica en los EE. UU. para las personas de más de 60 años de edad se estima que es de 3 a 8 por cada 100.000. En el 20 % de los casos da lugar a bacteriemia, y otras manifestaciones tales como meningitis, con una tasa de mortalidad cercana al 30 % incluso con tratamiento antibiótico.

El neumococo está encapsulado con un polisacárido unido químicamente que confiere la especificidad de serotipo. Hay 90 serotipos conocidos de neumococos, y la cápsula es el principal determinante de virulencia para los neumococos, ya que la cápsula no solo protege la superficie interna de las bacterias del complemento, sino que ella misma es poco inmunogénica. Los polisacáridos son antígenos independientes de T, y no se pueden procesar o presentar en moléculas del MHC para que interactúen con linfocitos T. Sin embargo, pueden estimular el sistema inmunitario por medio de un mecanismo alternativo que implica el entre-cruzamiento con receptores de superficie de linfocitos B.

Se ha demostrado en varios experimentos que la protección contra la enfermedad neumocócica invasiva se corresponde muy fuertemente con 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 de 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], por lo tanto, aumenta la incidencia de neumonía bacteriana en esta población [Verghese y Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].

El documento WO03/051392 desvela un conjugado vacunal de múltiples serotipos de *Streptococcus*

*pneumoniae*.

Es un objetivo de la presente invención desarrollar una formulación mejorada de un conjugado vacunal de polisacáridos de múltiples serotipos.

### **Breve descripción de las Figuras**

- 5 **Figura 1.** Gráfico de barras que muestra la inmunogenicidad de un conjugado de 11 valencias en monos Rhesus ancianos. Las barras más claras representan la GMC tras dos inoculaciones con el conjugado de 11 valencias en una adyuvante de fosfato de aluminio. Las barras más oscuras representan la GMC tras dos inoculaciones con el conjugado de 11 valencias en el adyuvante C.
- 10 **Figura 2.** Gráfico de barras que muestra los linfocitos B de memoria para PS3 tras la inoculación del conjugado de 11 valencias en adyuvante C o adyuvante de fosfato de aluminio.
- Figura 3.** Gráfico de barras que muestra la inmunogenicidad contra el polisacárido 19F en ratones Balb/c para los polisacáridos de 4 valencias planos y los conjugados de 4 valencias dPly.
- Figura 4.** Gráfico de barras que muestra la inmunogenicidad contra el polisacárido 22F en ratones Balb/c para los polisacáridos de 4 valencias planos y los conjugados de 4 valencias PhtD
- 15 **Figura 5.** Gráfico de barras que muestra la respuesta de IgG anti-22F en ratones Balb/c.
- Figura 6.** Gráfico de barras que muestran los títulos de opsono-fagocitosis contra 22F en ratones Balb/c.
- Figura 7.** Gráfico de barras que compara la respuesta de IgG inducida por ratones C57B1 jóvenes tras la inmunización con el conjugado vacunal de 13 valencias formulado con diferentes adyuvantes.
- 20 **Figura 8.** Gráfico de barras que muestra la eficacia de protección de diferentes combinaciones vacunales en un modelo de neumonía en monos.
- Figura 9.** 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 un desafío neumocócico tipo 4 en ratones tras la inmunización con 22F-PhtD o 22F-AH-PhtD.

### 25 **Descripción de la invención**

La presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende conjugados de sacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* de los serotipos 19A y 19F en los que 19A se conjuga con un primer toxoide bacteriano y 19F se conjuga con un segundo toxoide es el toxoide diftérico o CRM197 y que comprende además conjugados de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae*, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C y 23F, en los que el primer toxoide bacteriano es una proteína diferente del segundo toxoide bacteriano.

30 La expresión sacárido capsular incluye los polisacáridos capsulares y los oligosacáridos que se puedan derivar de los polisacáridos capsulares. Un oligosacárido contiene al menos 4 restos de azúcares. Los términos conjugar y conjugado se refiere a un sacárido capsular unido covalentemente con un vehículo proteico.

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

40 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 pertussis, citolisinas bacterianas o pneumolisina. Se han descrito mutaciones de pneumolisina (Ply) que disminuyen la toxicidad de la pneumolisina (documentos WO 90/06951, WO 99/03884). De manera similar, las mutaciones genéticas de la toxina diftérica que disminuyen su toxicidad se conocen (véase posteriormente). Los análogos genéticamente detoxicados de toxina diftérica 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. El CRM197 es una forma no tóxica de la toxina diftérica pero no se distingue inmunológicamente de la toxina diftérica. El CRM197 se produce por *C. diphtheriae* infectado por la fase  $\beta$ 197tox no toxigénica creada por mutagénesis por nitrosoguanidina del carinófago b toxigénico (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 esta por un único cambio de bases en el gen estructural. Esto da lugar a un cambio de una glicina por una glutamina en la posición de aminoácidos 52 que fabrica un fragmento A 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 p560-564).

- 5 Cuando el primer y segundo toxoides bacterianos son diferentes, significa que tienen una secuencia de aminoácidos diferente.
- Por ejemplo, se pueden conjugar el 19A y 19F a toxoide tetánico y toxoide diftérico; toxoide tetánico y CRM197; toxoide tetánico y pneumolisina; toxoide diftérico y toxoide tetánico; toxoide diftérico y CRM197, toxoide diftérico y pneumolisina; CRM197 y toxoide tetánico; CRM197 y toxoide diftérico; CRM197 y pneumolisina; pneumolisina y toxoide tetánico; pneumolisina y toxoide diftérico; o pneumolisina y CRM197, respectivamente.
- 10 En una realización, además de conjugados de sacáridos de *S. pneumoniae* de 19A y 19F, la composición inmunogénica comprende además conjugados de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F y 23F.
- 15 En una realización, además de los conjugados de sacáridos de *S. pneumoniae* de 19A y 19F, la composición inmunogénica comprende conjugados de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 3, 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 conjugados de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F y 23F.
- 20 Normalmente la vacuna de *Streptococcus pneumoniae* de la presente invención comprenderá sacáridos antígenos capsulares (opcionalmente conjugados), en la que los sacáridos se derivan de al menos 11 serotipos de *S. pneumoniae*. El número de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* puede variar desde al menos 11 serotipos diferentes (o "V", por valencias) a 23 serotipos diferentes (23V). En una realización hay 11, 12, 13, 14 o 15 serotipos diferentes. En otra realización de la invención, la vacuna puede comprender
- 25 sacáridos de *S. pneumoniae* y sacáridos no conjugados de *S. pneumoniae*. Opcionalmente, el número total de serotipos sacarídicos es menor o igual a 23. De manera similar, la vacuna puede comprender 11, 12, 13, 14 o 16 sacáridos conjugados y 12, 11, 10, 9 o 7 respectivamente, sacáridos no conjugados.
- 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, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F, aunque se aprecia que uno o dos 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. Una
- 30 vacuna pediátrica (de bebés) de 12 o 13 valencias también puede incluir la formulación de 11 valencias suplementada con los serotipos 6A y 19A, o 6A y 22F, o 19A y 22F, o 6A y 15B, o 19A y 15B, o 22F y 15B, mientras que una vacuna para ancianos de 13 valencias puede incluir la formulación de 11 valencias
- 35 suplementada con los serotipos 19A y 22F, 8 y 12F, o 8 y 15B, o 8 y 19A, o 8 y 22F, o 12F y 15B, o 12F y 19A, o 12F y 22F, o 15B y 19A, o 15B y 22F. una vacuna pediátrica de 14 valencias puede incluir la formulación de 10 valencias descrita anteriormente suplementada con los serotipos 3, 6A, 19A y 22F; serotipos 6A, 8, 19A y 22F; serotipos 6A, 12F, 19A y 22F; serotipos 6A, 15B, 19A y 22F; serotipos 3, 8, 19A y 22F; serotipos 3, 12F, 19A y 22F; serotipos 3, 15B, 19A y 22F; serotipos 3, 6A, 8 y 22F; serotipos 3, 6A, 12F y 22F; o serotipos 3, 6A, 15B y 22F.
- 40 En una realización adicional de la invención, al menos se incluyen 2 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 sacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F, aunque también se contemplan sacáridos antigénicos adicionales, por ejemplo de 23 valencias (tales como los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F).
- 45 La vacuna de la presente invención puede comprender proteína D (PD) de *Haemophilus influenzae* (véase, por ejemplo, el documento EP 0594610). *Haemophilus influenzae* es un organismo causal clave de 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* (referencia a publicación POET). En una realización, la composición vacunal comprende la proteína D. En un aspecto, la PD está presente como un vehículo proteico para 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 más, la proteína D está presente como un vehículo proteico y como una proteína libre. La proteína D se puede utilizar como una proteína de longitud completa o como un fragmento
- 55 (documento WO0056360). En un aspecto adicional, la proteína D está presente como un vehículo proteico para la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8, 9 o más de los sacáridos se pueden conjugar a la

proteína D. En este aspecto, la proteína D puede estar presente también como una proteína libre.

La vacuna de la presente invención comprende uno, dos, o más tipos diferentes de vehículos proteicos. Cada tipo de vehículo proteico puede actuar como un vehículo para más de un sacárido, cuyos sacáridos pueden 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 pueden conjugarse, o 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 aparte de 19A y 19F se puede conjugar con un vehículo proteico seleccionado independientemente de entre el grupo que consiste en fusiones de TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, PhtD, PhtBE, o PhtDE (particularmente los descritos en los documentos WO 01/98334 y WO 03/54007), pneumolisina detoxificada y proteína D. Una lista más completa de 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 es opcionalmente un miembro de la familia de las proteínas de la tríada polihistidina (Pht), fragmentos o proteínas de fusión de los mismos. Las proteínas PhtA, PhtB, PhtD o PhtE pueden tener una secuencia de aminoácidos que comparte un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con una secuencia que se desvela en los documentos WO 00/37105 o WO 00/39299 (por ejemplo, con la secuencia de aminoácidos 1-838 o 21-838 de SEQ ID NO: 4 del documento WO 00/37105 para PhtD). Por ejemplo, las proteínas de fusión están compuestas por la longitud completa o fragmentos de 2, 3 o 4 de PhtA, PhtB, PhtD, PhtE. Ejemplos de proteínas de fusión son PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E, PhtD/A, PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B y PhtE/D, en las que las proteínas están unidas con la primera mencionada en el extremo N (véase, por ejemplo, el documento WO01/98334).

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

En particular, el término "PhtD" como se utiliza en el presente documento incluye la proteína de longitud completa con la secuencia de señal unida, la proteína de longitud completa madura con el péptido de señal eliminado (por ejemplo 20 aminoácidos del extremo N), variantes de PhtD de origen natural y fragmentos inmunogénicos de PhtD (por ejemplo, fragmentos como se han descrito anteriormente o polipéptidos que comprenden al menos 15 o 20 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos de los documentos WO 00/37105 o WO 00/39299 en los que dicho polipéptido es capaz de producir una respuesta inmunitaria específica para dicha secuencia de aminoácidos de los documentos WO 00/37105 o WO 00/39299 (por ejemplo, SEQ ID NO: 4 de WO 00/37105 para PhtD).

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 ellas) [véase por ejemplo, el documento WO 04/083251]. De manera alternativa los sacáridos pueden estar cada uno conjugado por separado a diferentes moléculas del vehículo proteico (cada molécula de vehículo proteico solo tiene un tipo de sacárido conjugado con ella).

Ejemplos de vehículos proteicos que se pueden utilizar en la presente invención están DT (toxóide diftérico), TT (toxóide tetánico) o fragmento C de RR, 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; eliminación o mutación de Glu-148 en Asp, Gln o Ser y/o Ala 158

por Gly y otras mutaciones desveladas en los documentos US 4709017 o US 4950740; o el fragmento desvelado en el documento US 5843711, la pneumolisina neumocócica (Kuo y col., (1995) Infect Immun 63; 2706-13) incluyendo la Ply detoxificada de alguna manera, por ejemplo, dPLY-GMBS (documentos WO 04081515, PCT/EP2005/010258) o dPLY-formol, PhtX, que incluyen PhtA, PhtB, PhtD, PhtE y fusiones de proteínas Pht, por ejemplo, fusiones PhtDE, fusiones PhtBE (documentos WO 01/98334 y WO 03/54007), (se describe la Pht A-E con más detalle posteriormente), OMPC (proteína de membrana externa meningocócica – extraída habitualmente del serogrupo B de *N. meningitidis* – documento EP0372501), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae* – véase por ejemplo, el documento EP 0 594 610 B), o equivalentes inmunológicamente funcionales de los mismos, péptidos sintéticos (documentos EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas pertussis (documentos WO 98/58668, EP0471177), citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4+ humanos de antígenos derivados de distintos 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 PspA de superficie neumocócica (documento WO 02/091998), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B of *C. difficile* (documento WO 00/61761).

Nurkka y col., Pediatric Infectious Disease Journal. 23(11):1008-14, Nov de 2004. describían una vacuna neumocócica de 11 valencias con todos los serotipos conjugados a la PD. Sin embargo, los presentes inventores han demostrado que la actividad de opsono-fagocitosis mejoraba por 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 aprecia una reactividad cruzada mayor con 19A cuando se conjuga 19F con DT. Por lo tanto, una característica de la composición de la presente invención es que el serotipo 19F se conjuga con 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, pneumolisina, DT o CRM197. Los serotipos de sacárido restantes de la composición inmunogénica se pueden conjugar todos con uno o más vehículos proteicos que no sean DT (es decir, solamente el 19F se conjuga con DT), o pueden dividirse entre uno o más vehículos proteicos que no sean DT y el DT mismo. En una realización, 19F se conjuga con DT o CRM197 y todos los serotipos restantes se conjugan con PD. En una realización adicional, 19F se conjuga con DT o CRM 197, y los restantes serotipos se dividen entre PD, y TT o DT o CRM197. En una realización adicional, el 19F se conjuga con DT o CRM197 y no se conjuga más de un sacárido con TT. En un aspecto de esta realización, dicho un sacárido es 18C o 12F. En una realización adicional, 19F se conjuga con DT o CRM 197, y no más de dos sacáridos se conjugan con TT. En una realización adicional, 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, 19F se conjuga con DT o CRM197, y el resto de serotipos se dividen entre PD, TT y pneumolisina. En una realización adicional, 19F se conjuga con DT o CRM197, y los restantes serotipos se dividen entre PD, TT y CRM197. En una realización adicional, 19F se conjuga con DT o CRM197, y los restantes serotipos se dividen entre PD, TT, pneumolisina y opcionalmente PhtD o la proteína de fusión PhtD/E. En una realización adicional, 19F se conjuga con DT o CRM197, 19A se conjuga con pneumolisina o TT y los serotipos restantes se dividen entre PD, TT, pneumolisina y opcionalmente PhtD o la proteína de fusión PhtD/E. En una realización adicional, 19F se conjuga con DT o CRM197, 19A se conjuga con pneumolisina 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 19F se conjuga con DT o CRM 197, 19A se conjuga con pneumolisina, un sacárido adicional se conjuga con TT, un sacárido adicional se conjuga con pneumolisina, 2 sacáridos adicionales se conjugan con PhtD o PhtD/E y todos los sacáridos adicionales se conjugan con PD.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende proteína D de *Haemophilus influenzae*. En esta realización, si la PD no es una de los vehículos proteicos utilizados para conjugarse con cualquier sacárido distinto del 19F, por ejemplo, el 19F se conjuga con DT mientras que los otros serotipos se conjugan con uno o más vehículos proteicos que no son PD, entonces la PD estará presente en la composición vacunal como una proteína libre. Si la PD es uno de los vehículos proteicos utilizados para conjugar sacáridos distintos de 19F, entonces PD puede estar presente opcionalmente en la composición como una proteína libre.

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

Los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* comprenden unidades de oligosacárido repetidas que pueden contener hasta 8 restos de azúcares. Para una revisión de las unidades de oligosacárido 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 de 2005, vol. 77, nº 2, p. 293-324. ISSN 0001-3765. En una realización, un antígeno sacárido capsular puede ser un polisacárido de longitud completa, sin embargo en otros puede ser una unidad de oligosacárido, o más corta que una cadena de sacárido de longitud nativa de unidades repetidas de oligosacáridos. En una realización todos los sacáridos presentes en la vacuna son polisacárido. Los polisacáridos de longitud completa se pueden "modificar de tamaño", es decir, su tamaño se puede reducir por distintos procedimientos tales como por tratamiento de hidrólisis, tratamiento con peróxido de hidrógeno, modificación de tamaño por emulsiflex® seguido por un tratamiento con peróxido de hidrógeno para generar fragmentos de oligosacárido o microfluidización.

Los inventores también han señalado que el foco de la técnica ha sido utilizar oligosacáridos para facilitar la producción de conjugados. Los inventores han descubierto que utilizando conjugados de polisacárido nativo o ligeramente modificado de tamaño, se pueden conseguir una o más de las siguientes ventajas: 1) un conjugado que tienen alta inmunogenicidad que es filtrable, 2) la relación de polisacárido respecto a proteína (p/p) en el conjugado se puede alterar de manera que la relación de polisacárido respecto a proteína (p/p) en el conjugado pueda aumentarse (lo que puede tener un efecto sobre el efecto de supresión del vehículo), 3) los conjugados inmunogénicos que tienden a la hidrólisis se pueden estabilizar por el uso de sacáridos más grandes en la conjugación. El uso de polisacáridos más grandes puede dar como resultado más entrecruzamiento con el vehículo conjugado y puede disminuir la liberación de sacárido libre del conjugado. Las vacunas de conjugado descritas en la técnica anterior tienden a despolimerizar los polisacáridos antes de la conjugación con el fin de mejorar la conjugación. Los presentes inventores han encontrado que las vacunas de conjugado sacárido que mantienen un tamaño mayor de 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 (media de peso del peso molecular; Pm) de cada sacárido antes de la conjugación está por encima de los 80 kDa, 100 kDa, 200 kDa, 300 kDa, 400 kDa, 500 kDa o 1000 kDa. En una realización el conjugado tras la conjugación debería ser filtrable fácilmente a través de un filtro de 0,2 micras de manera que se obtiene un rendimiento de más de 50, 60, 70, 80, 90 o 95 % post filtración en comparación con la muestra pre-filtración.

Para los fines de la invención, "polisacárido nativo" se refiere a un sacárido que no se ha sometido a un procedimiento, el fin del cual es reducir el tamaño del sacárido. Un polisacárido se puede convertir en ligeramente reducido de tamaño durante los procedimientos normales de purificación. Dicho sacárido sigue siendo nativo. Solamente si el polisacárido se ha sometido a técnicas de modificación de tamaño se consideraría que el polisacárido no es nativo.

Para los fines de la invención "modificado por un factor de hasta x2" significa que el sacárido se somete a un procedimiento con la intención de reducir el tamaño del sacárido pero que mantenga un tamaño mayor 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 con la intención de reducir el tamaño del polisacárido pero que mantenga un tamaño mayor de un tercio, un cuarto, etc. del tamaño del polisacárido nativo. En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica que comprende sacáridos de *Streptococcus pneumoniae* de 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 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 en 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, 9 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 media del peso molecular de un sacárido del presente documento se refiere al peso medio del peso molecular (Pm) del sacárido medido antes de la conjugación como se mide por MALLS.

La técnica MALLS es bien conocida 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 de luz (por ejemplo un DSP Wyatt Dawn equipado con un láser de 10 mW a 488 nm) y un refractómetro interferométrico (por ejemplo un DSP Wyatt Otilab 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 microfluidización o sonicación. La microfluidización y sonicación tienen la ventaja de disminuir el tamaño de los polisacáridos nativos más grandes lo suficiente para proporcionar un conjugado filtrable. La

modificación del 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 se producen a partir de una mezcla de polisacáridos nativos y sacáridos que se han modificado de tamaño por un factor de no más de x20. En un aspecto de esta realización, la mayoría de los sacáridos, por ejemplo 6, 7, 8 o más de los sacáridos se modifican de tamaño por un factor de hasta x2, x3, x4, x5, o x6.

En una realización, el sacárido de *Streptococcus pneumoniae* se conjuga con el vehículo proteico por medio de un engarce, por ejemplo un engarce bifuncional. El engarce es opcionalmente heterobifuncional u homobifuncional, que tienen por ejemplo un grupo amino reactivo y un grupo de ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amino reactivos o dos grupos de ácido carboxílico reactivos. 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-propionamido (documento WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gevers y col., (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), haloalquil hálidos (documento US4057685), enlaces glucosídicos (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 podría 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 puede por lo tanto acoplarse directamente o por medio de un grupo espaciador (engarce) a un grupo amino del vehículo proteico. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para dar un polisacárido tiolado que se podría acoplar al vehículo por medio de un enlace tioéter obtenido tras la reacción con un vehículo proteico activado por maleimida (por ejemplo, utilizando GMBS) o un vehículo proteico haloacetilado (por ejemplo utilizando yodoacetimida [por ejemplo, etil yodoacetimida HCL] o N-succinimidil bromoacetato 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 de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) por medio de un grupo carboxilo del vehículo proteico. Dichos conjugados se describen en la solicitud publicada PCT WO 93/15760 Uniformed Services University y documentos WO 95/08348 y WO 96/29094.

Otras técnicas adecuadas utilizan carbodiimidias, carbiinidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU. Muchos se describen en el documento WO 98/42721. La conjugación puede implicar un engarce carbonilo que se puede formar por la 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) seguida por la reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Esto puede implicar la reducción del extremo anomérico en un grupo hidroxilo primario, opcional protección/desprotección del grupo hidroxilo primario, reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un carbamato CDI intermedio y acoplamiento del carbamato CDI intermedio con un grupo amino de una proteína.

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

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

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

También se pueden utilizar una combinación de técnicas, estando algunos conjugados sacárido-proteína preparados por CDAP, y algunos por aminación reductora.

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 ácido aspártico o ácido glutámico). En una realización este grupo se une a los grupos amino de los sacáridos directamente o a un grupo amino de un engarce con química



carbodiimida, por ejemplo con EDAC.

- 5 B) Grupo amino (por ejemplo, por medio de lisina). En una realización, este grupo se une a grupos carboxilos de 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 en 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.
- C) Sulfhidrilo (por ejemplo, por medio de cisteína). En una realización este grupo se une a un sacárido o engarce bromo o cloro acetilado con química maleimida. En una realización, este grupo está activado/modificado por bis diazobencidina.
- 10 D) Grupo hidroxilo (por ejemplo, por medio de tirosina). En una realización este grupo se activa/modifica con bis-diazobencidina.
- E) Grupo imidazolilo (por ejemplo, por medio de histidina). En una realización, este grupo se activa/modifica con bis-diazobencidina.
- F) Grupo guanidilo (por ejemplo, por medio de arginina).
- 15 G) Grupo Indolilo (por ejemplo, por medio de triptófano).

En un sacárido, en general se pueden utilizar los siguientes grupos para un 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:*

- 20 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  
 Sacárido-NH<sub>2</sub> + COOH-Prot + EDAC ----> conjugado

*Estrategias de acoplamiento indirecto por medio de un espaciador (engarce):*

- 25 Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> → Sacárido - NH<sub>2</sub> + COOH - Prot + EDAC → conjugado
- 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 ejemplo, por SPDP) → Sacárido-S-S-Prot
- 30 Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH<sub>2</sub> - SH → Sacárido----SH + maleimida - Prot (modificación de grupos amino) → conjugado
- 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
- 35 Sacárido-COOH + EDAC+ NH<sub>2</sub> - SH → Sacárido - SH + SH-Prot (Proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenido tras la modificación de grupos amino de la proteína, por ejemplo, por SPDP) → Sacárido-S-S-Prot
- Sacárido-COOH + EDAC+ NH<sub>2</sub> - SH → Sacárido - SH + maleimida-Prot (modificación de grupos amino) → conjugado
- 40 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 como anteriormente, se puede utilizar cualquier carbodiimida.

- 45 En resumen, los tipos de grupo químico del vehículo proteico que se puede utilizar en general para el acoplamiento con un sacárido son grupos amino (por ejemplo sobre restos de lisina), grupos COOH (por ejemplo sobre restos de ácido aspártico y ácido glutámico) y grupos SH (si están accesibles) (por ejemplo sobre restos de cisteína).

Opcionalmente la relación de vehículo proteico con 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.

5 En una realización, se conjuga al menos un sacárido de *S. pneumoniae* con un vehículo proteico por medio de un engarce utilizando CDAP y EDAC. Por ejemplo, el 18C se puede conjugar con una proteína por medio de un engarce (por ejemplo los que tienen dos grupos hidracino en sus extremos tal 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 la proteína, o de manera alternativa, se puede utilizar primero EDAC para conjugar el engarce a la proteína, tras lo cual se puede utilizar CDAP para conjugar el engarce al sacárido.

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

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

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

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

30 La composición inmunogénica puede comprender proteínas de *Streptococcus pneumoniae*, denominadas en el presente documento como 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 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 vital del neumococo, o son proteínas que se secretan o liberan por el neumococo. Opcionalmente las proteínas de la invención se seleccionan de entre las siguientes categorías, tal como proteínas que tienen el motivo de secuencia de señal Tipo II, LXXC (donde X es cualquier aminoácido, 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.

40 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 la tríada de polihistidina (PhtX), familia de proteínas que se unen a colina (CbpX), CbpX truncadas, familia LytX, LytX truncadas, proteínas quiméricas (o fusiones) de CbpX truncada-LytX truncada, pneumolisina (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 colina (CbpX), CbpX truncadas, familia LytX, LytX truncadas, proteínas quiméricas (o fusiones) de CbpX truncada-LytX truncada, pneumolisina (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 colina (CbpX), CbpX truncadas, familia LytX, LytX truncadas, proteínas quiméricas (o fusiones) de CbpX truncada-LytX truncada, pneumolisina (Ply) y Sp128.

55 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 nucleósidos o actividad enzimática, (3-5) regiones superenrolladas, una extremo N conservado y un extremo C heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos ensayados. También se han encontrado proteínas homólogas en otros estreptococos y neiserias. En una realización de la invención, la proteína Pht de la invención es PhtD. Se entiende, sin embargo, que los términos Pht A, B, D, y E se refieren a proteínas que tienen las secuencias desveladas en las referencias posteriores así como a las variantes de origen natural (y artificial) de las mismas que tienen una homología de secuencia con al menos un 90 % de identidad con las proteínas a las

que se hace referencia. Opcionalmente es al menos un 95 % de identidad o al menos un 97 % de identidad.

Con respecto a las proteínas PhtX, la PhtA se desvela en el documento WO 98/18930, y a la que también se hace referencia como Sp36. Como se ha señalado anteriormente, es una proteína de la familia de tríadas de polihistidina que tiene el motivo de señal tipo II de LXXC. La PhtD se desvela en el documento WO 00/37105, y a la que también se hace referencia 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. PhtB se desvela en el documento, y a la que también se hace referencia 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, un 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 también se considera un miembro de la familia PhtX. La PhtE se desvela en el documento WO00/30299 y a la que se hace referencia como BVH-3. Cuando se hace referencia en el presente documento a cualquier proteína Pht, dignifica que se pueden utilizar los fragmentos inmunogénicos o fusiones de los mismos de la proteína Pht. Por ejemplo, una referencia a PhtX incluye los fragmentos inmunogénicos o fusiones de los mismos de cualquier proteína Pht. Una referencia a PhtD o PhtB también hace referencia a fusiones PhtDE o PhtBE como se encuentran, por ejemplo, en el documento WO0198334.

La pneumolisina es una toxina multifuncional con distintas actividades citolíticas (hemolíticas) y de activación del complemento (Rubins y col., *Am. Respi. Cit Care Med*, 153:1339-1346 (1996)). La toxina no se secreta por los neumococos, pero se libera al lisarse los neumococos por la influencia de una autolisina. Sus efectos incluye, por ejemplo, la estimulación de la producción de citocinas inflamatorias por los monocitos humanos, la inhibición de la pulsación de los cilios del epitelio respiratorio humano, y el descenso de la actividad bactericida y la migración de neutrófilos. El efecto más obvio de la pneumolisina es la lisis de glóbulos rojos, que implica la unión al colesterol. Debido a que es una toxina, es necesario detoxicarla (es decir, que no sea tóxica para un ser humano cuando se proporciona como una dosificación adecuada para la protección) antes de que se pueda administrar in vivo. La expresión y clonación de la pneumolisina de tipo silvestre o nativa 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, someténdola a un 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 varias toxinas. De manera alternativa, la Ply se puede detoxicar genéticamente. Por lo tanto, la invención engloba derivados de proteínas neumocócicas que pueden ser, por ejemplo, proteínas mutadas. El término "mutado" como se utiliza en el presente documento significa una molécula que se ha sometido a eliminación, adición o sustitución de uno o más aminoácidos utilizando técnicas bien conocidas por mutagénesis dirigida al sitio o cualquier otro procedimiento convencional. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, se puede alterar una proteína Ply mutante de manera que sea biológicamente inactiva mientras que mantiene sus epítopos inmunogénicos, véase, por ejemplo, el documento WO90/06951, Berry y col., (*Infect Immun*, 67:981-985 (1999)) y el documento WO99/03884.

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

En lo que concierne a la familia de la proteína de unión a colina (CbpX), los miembros de esa familia se identificó originalmente como proteínas neumocócicas que se podía purificar por cromatografía de afinidad a colina. Todas las proteínas de unión a la colina están unidas 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 en toda la familia, aunque la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia de aminoácidos, longitud, etc.) puede variar. En general las proteínas de unión a la colina comprenden una región terminal N (N), regiones de repetición conservadas (R1 y/o R2), una región rica en prolina (P) y una región de unión a la colina conservada (C), que se compone de múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente la mitad de la proteína. Como se utiliza en la presente solicitud, la expresión "familia de proteínas de unión a la colina (CbpX)" se selecciona de entre el grupo que consiste en Proteínas de unión a la colina como se identifica en el documento WO97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, y CbpG. CbpA 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 define anteriormente y "truncadas" se refiere a proteínas CbpX que carecen del 50 % o más de la región de unión a la colina (C). Opcionalmente, dichas proteínas carecen de la región de unión a la colina completa. Opcionalmente, dichas proteínas truncadas carecen de (i) la región de unión a la colina y (ii) una parte de la mitad terminal N de la proteína también, aunque mantiene al menos una región de repetición (R1 o R2). Opcionalmente, la

truncada tiene 2 regiones repetidas (R1 y R2). Ejemplos de tales realizaciones son NR1xR2 y R1xR2 como se ilustra en los documentos WO99/51266 o WO99/51188, sin embargo, otras proteínas de unión a la colina que carezcan de una región de unión a la colina similar también se contemplan en el ámbito de la presente invención.

5 La familia LytX la forman proteínas asociadas a la membrana que se asocian con lisis celular. El dominio terminal N comprende un dominio(s) de unión a la colina, sin embargo la familia LytX no tiene todas las características que se encuentran en la familia CbpA señaladas 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 terminal C contiene el dominio catalítico de la familia de proteínas LytX. La familia  
10 comprende LytA, B y C. Con respecto a la familia LytX, LytA se desvela en Ronda y col., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). LytB se desvela en el documento WO 98/18930, y a la que también se hace referencia como Sp46. LytC también se desvela en el documento WO 98/18930, y a la que también se hace referencia como Sp91. Una realización de la invención comprende LytC.

15 Otra realización comprende LytX truncadas en las que "LytX" se define anteriormente y "truncadas" se refiere a proteínas LytX que carecen del 50 % o más de la región de unión a la colina. Opcionalmente dichas proteínas carecen de la región de unión a la colina completa. En otra realización más de la presente invención comprende proteínas quiméricas (o fusiones) de CbpX truncada-LytX truncada. Opcionalmente comprende NR1xR2 (o R1xR2) de CbpX y la parte terminal C (Cterm, es decir, que carece de los dominios de unión a la colina) de LytX (por ejemplo LytCCterm o Sp91 Cterm). Opcionalmente, la CbpX se selecciona  
20 de entre el grupo que consiste en CbpA, PbcA, SpsA y PspC. Opcionalmente, es CbpA. Opcionalmente, LytX es LytC (a la que se hace referencia también como Sp91). Otra realización de la presente invención es 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 LytX es LytC.

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

30 Sp128 y Sp130 se desvelan en el documento WO00/76540. Sp125 es un ejemplo de proteína de superficie neumocócica con el motivo anclado de pared celular de LPXTG (donde X es cualquier aminoácido). Cualquier proteína en esta clase de proteínas de superficie neumocócica con este motivo se ha descubierto que es útil en el contexto de la presente invención, y por lo tanto se considera como una proteína adicional de la invención. La Sp125 misma se desvela en el documento WO 98/18930, y también se conoce como ZmpB – una metaloproteínasa de zinc. La Sp101 se desvela en el documento WO 98/06734 (en el que tiene el número de referencia y85993). Se caracteriza por una secuencia de señal Tipo I. La Sp133 se desvela en  
35 el documento WO 98/06734 (en el que tiene el número de referencia y85992). También se caracteriza por una secuencia de señal Tipo I.

Ejemplos de los antígenos proteicos 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 del mismo (documento WO 0018910); LbpA y/o LbpB  
40 [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); OmplA1 (documento PCT/EP99/06781); Hly3 (documento PCT/EP99/03257); y OmpE. Ejemplos de antígenos de *Haemophilus influenzae* no tipable o fragmentos de los mismos se pueden incluir en una combinación vacunal (especialmente para la prevención de la otitis media) incluyen: Proteína Fimbrina [(US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] y fusiones que comprenden péptidos de la misma [por ejemplo, fusiones de péptido LB1(f); documentos US  
50 5843464 (OSU) o WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (State University de Nueva York)]; TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (documento WO 94/12641); P2; y P5 (documento WO 94/26304).

55 Las proteínas de la invención también se pueden combinar beneficiosamente. Por combinado se quiere significar que la composición inmunogénica comprende todas las proteínas de las siguientes combinaciones. bien como vehículos proteicos o como proteínas libres o una mezcla de las dos. Por ejemplo, en una combinación de dos proteínas como se expone a partir de ahora, 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 un vehículo proteico y como proteína libre mientras que la otra está presente solo como vehículo proteico o solo como proteína libre, o una puede estar presente como un vehículo proteico y la otra como una proteína libre. Cuando se da  
60 una combinación de tres proteínas, existen posibilidades similares. Las combinaciones incluyen, pero no se

- limitan a PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91Cterm quiméricas o proteínas de fusión, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1 xR2-Sp91 Cterm quiméricas o proteínas de fusión, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. 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 pneumolisina detoxicada y PhtD o PhtDE como vehículos proteicos. En una realización adicional, la composición vacunal comprende pneumolisina detoxicada y PhtD o PhtDE como proteínas libres.
- 10 En un aspecto independiente, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende al menos cuatro conjugados de sacáridos capsulares 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 producir una respuesta inmunitaria eficaz contra PhtD.
- 15 Una respuesta inmunitaria eficaz contra PhtD o 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 7 días después del desafío con una cepa heteróloga. Debido a que la cepa de desafío es heteróloga, la protección que se logra es debida a la respuesta inmunitaria contra PhtD o la proteína de fusión de la misma.
- 20 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 de al menos 250, 300, 350, 400, 500, 550 o 600 µg/ml GMC.
- 25 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 los serotipos 22F y 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 adicionales seleccionados de entre los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 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 a PhtD o una proteína de fusión de la misma.
- 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 por medio de un engarce, por ejemplo ADH. En una realización, se utiliza una de las químicas de conjugación enumeradas posteriormente.
- 35 En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende al menos un sacárido capsular de *S. pneumoniae* conjugado con una PhtD o una proteína de fusión de la misma, en el 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 de (es decir, contiene una proporción mayor de PhtD) 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 pneumolisina.
- 40 La presente invención proporciona además una vacuna que contiene las composiciones inmunogénicas de la invención y un excipiente aceptable farmacéuticamente. La presente invención proporciona además un procedimiento para fabricar una vacuna que comprende la etapa de mezclar la composición inmunogénica de la invención con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45 Las vacunas de la presente invención se puede adyugar, particularmente cuando se tiene la intención de utilizarla en una población anciana pero también para su uso en poblaciones infantiles. Los adyuvantes adecuados incluyen sales de aluminio tales como el gel de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o alúmina, pero puede ser también otras sales metálicas como las de calcio, magnesio, hierro o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, sacáridos derivados catiónica o aniónicamente, o polifosfacenos.
- 50 El adyuvante se selecciona opcionalmente para que sea un inductor preferencial de un tipo de respuesta TH1. Dichos altos niveles de citocinas tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células para un determinado antígeno, mientras que los altos niveles de citocinas tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humoresales al antígeno.
- 55 La distinción de las respuestas inmunitarias tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad un individuo tendrá una respuesta inmunitaria que se describe como que es predominantemente Th1 o predominante Th2. Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de lo que describen en clones de linfocitos T CD4+ por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. (Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 se asocian con la producción de INF-γ y citocinas IL-2 por los linfocitos T. Otras citocinas asociadas a menudo directamente con la inducción de las

respuestas inmunitarias tipo Th1 no se producen por linfocitos T, tales como IL-12. Por el contrario, las respuestas tipo Th2 se asocian con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Sistemas adyuvantes adecuados que promuevan una respuesta predominantemente Th1 incluyen: Monofosforil lípido A o na derivado del mismo (o 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 monofosforil lípido A3-des-O-acilado junto con 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 a alúmina [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 se desvela en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica donde el QS21 se inactiva con colesterol como se desvela en el documento WO 96/33739. Una formulación de adyuvante particularmente potente 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 oligonucleótidos que contiene CpG no metilado (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 y combinaciones de los mismos.

Un adyuvante que se puede utilizar con las composiciones vacunales de la invención son preparaciones en ampollas o vesículas de la 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 mejorarse por retención de LOS (lipooligosacáridos) en su superficie (por ejemplo, mediante la extracción con bajas concentraciones de detergente [por ejemplo un 0-0,1 % de desoxicolato]). Los LOS se pueden detoxicar por medio de mutaciones *msbB* (-) o *htrB* (-) que se tratan en el documento WO02/09746. Las propiedades adyuvantes se pueden mejorar por retención de *PorB* (y opcionalmente eliminando *PorA*) de las ampollas meningocócicas. Las propiedades adyuvantes también pueden mejorarse truncando la estructura externa del núcleo de sacárido de LOS en las ampollas meningocócicas – por ejemplo por medio de una mutación *IgtB* (-) como se trata en el documento WO2004/014417. De manera alternativa, los LOS mencionados anteriormente (por ejemplo aislados de una cepa *msbB* (-) y/o *IgtB* (-)) se pueden purificar y utilizarse como un adyuvante en las composiciones de la invención.

Un adyuvante adicional que se puede utilizar con las composiciones de la invención se puede seleccionar de entre el grupo: una saponina, lípido A o un derivado de los mismos, 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 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, las combinaciones contienen opcionalmente una saponina (en particular QS21) adyuvante y/o un agonista de receptor 9 tipo Toll tal como un oligonucleótido inmunoestimulantes que contiene CpG. Otras combinaciones comprenden una saponina (en particular QS21) y un agonista del receptor 4 tipo Toll tal como monofosforil lípido A o su derivado 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 formulado 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 Glaxo SmithKline Biologicals North America y primariamente promueve respuestas de linfocitos T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). Esto se puede producir 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 3D-MPL de partícula pequeña. La pequeña partícula de 3D-MPL tiene un tamaño de partícula de manera que puede esterilizarse por filtración a través de un filtro de 0,22 mm. Dichas preparaciones se describen en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/21292. Los derivados sintéticos de lípido A se conocen y se piensan que son agonistas TLR 4, pero no se limitan a:

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

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

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

Otros ligandos TLR 4 que se pueden utilizar son fosfatos de alquil glucosaminida (AGP) tales como los que se desvelan en los documentos WO9850399 o US6303347 (también se desvelan los procedimientos para la preparación de AGP), o sales de AGP farmacéuticamente aceptables como se desvela en el documento US6764840. Algunos AGP son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas TLR4. Se piensa que ambos son útiles como adyuvantes.

Otro inmunoestimulante para su uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol sudamericano Quilaja Saponaria Molina y se describió por primera vez que tenía actividad adyuvantes por Dalsgaard y col., in 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254). Los fragmentos purificados de Quil A se han aislado por HPLC que mantiene la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo, QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS21 es una saponina derivada de la corteza de Quilaja saponaria Molina que induce linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL), células Th1 y una respuesta de anticuerpos predominante en 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 adicionalmente un esteroil (documento WO96/33739). Las saponinas que forman parte de la presente invención se pueden separar 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 tales como complejos multiméricos tipo gusano o tipo anillo o estructuras lipídicas/laminadas y lamelas 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 en una emulsión de aceite en agua.

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

También se pueden utilizar oligonucleótidos inmunoestimulantes o cualquier otro receptor 9 tipo Toll (TLR). Los oligonucleótidos para su uso en los adyuvantes o vacunas de la presente invención son opcionalmente oligonucleótidos que contienen CpG, opcionalmente contienen dos o más motivos CpG dinucleotídicos separados por al menos tres, opcionalmente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido Citosina seguido por un nucleótido Guanina. Los oligonucleótidos CpG de la presente invención son típicamente desoxinucleótidos. En una realización, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o un enlace fosforotioato, aunque están en el ámbito de la invención enlaces fosfodiéster y otros enlaces internucleotídicos. También se incluyen en el ámbito de la invención oligonucleótidos con uniones internucleotídicas mezcladas. Los procedimientos para producir oligonucleótidos fosforotioato o fosforoditioato se describen en los documentos US 5.666.153, US 5.278.302 y WO95/26204.

Ejemplos de oligonucleótidos tienen las siguientes secuencias. Las secuencias contienen opcionalmente uniones internucleotídicas de fosforotioato modificadas.

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)

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

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

El adyuvante puede ser una emulsión de aceite en agua o puede comprender una emulsión de aceite en agua en combinación con otros adyuvantes. La fase oleosa del sistema de emulsión comprende opcionalmente un aceite metabolizable. El significado de la expresión aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Metabolizable se puede definir como "que es capaz de ser transformado por metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o sintético, que no sea tóxico para el receptor y es capaz de ser transformado por metabolismo. Los frutos secos, y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también son parte de la 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-tetraicosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón, y en pequeñas cantidades en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y levadura, 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 del colesterol (índice Merck, 10ª Edición, entrada nº 8619).

Los tocoles (por ejemplo, la vitamina E) a menudo se utilizan también en adyuvantes de emulsiones oleosas (documentos EP 0 382 271 B1; US5667784; WO 95/17210). Los tocoles que se utilizan en las emulsiones oleosas (opcionalmente en 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 manera alternativa, se pueden utilizar los tocoles 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 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 para las vacunas (documentos WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Otros adyuvantes de emulsión oleosa se han descrito, tales como las emulsiones de agua en aceite (documentos US 5.422.109; EP 0 480 982 B2) y emulsiones de agua 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, emulsiones de aceite en agua) comprenden además un emulsionante tal como TWEEN80 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, el escualeno o un tocoferol tal como el tocoferol alfa (y opcionalmente ambos escualeno y tocoferol alfa) y opcionalmente un emulsionante (o tensioactivo) tal como el Tween 80. Un esteroles (por ejemplo, colesterol) se puede incluir también. El procedimiento para producir emulsiones de aceite en agua se conoce bien por el experto en la técnica. Comúnmente, el procedimiento comprende mezclar la fase oleosa que contiene tocol con un tensioactivo tal como una solución PBS/TWEEN80™, seguido por la homogeneización utilizando un homogeneizador, estaría claro para un experto en la técnica que un procedimiento que comprende el paso de la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringa sería adecuado para homogeneizar pequeños volúmenes de líquido. De igual manera, el procedimiento de emulsión en un microfluidificador (máquina de Microfluidica M110S, máximo de 50 pasajes, durante un periodo de 2 minutos a presión máxima de entrada de 6 bares (presión de salida de aproximadamente 850 bares)) podría adaptarlo 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 aceites 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 menos de 1 micra, puede estar en el intervalo de sustancialmente de 30-600 nm,



opcionalmente sustancialmente alrededor de 30-500 nm de diámetro, y opcionalmente sustancialmente de 150-500 nm de diámetro, y en particular aproximadamente 150 nm de diámetro como se mide por espectroscopia de correlación de fotones. A este respecto, el 80 % de las gotas de aceite por número debería estar en los intervalos, opcionalmente más del 90 % y opcionalmente más del 95 % de las gotas por número están en los intervalos de tamaño definidos. Las cantidades de componentes presentes en las emulsiones oleosas de la presente invención están convencionalmente en el intervalo de desde un 0,5-20 % o 2 a 10 % de aceite (del volumen total de la dosis), tal como escualeno; y cuando están presentes de un 2 a 10 % de tocoferol alfa; y desde un 0,3 a 3 % de tensioactivo, tal como monooleato de sorbitan polioxietileno. Opcionalmente la relación de aceite (por ejemplo, escualeno): tocol (por ejemplo  $\alpha$ -tocoferol) es igual o menor de 1, ya que esta proporciona una emulsión más estable. Un emulsionante, tal como Tween 80 o Span 85 también puede estar presente a un nivel de aproximadamente el 1 %. En algunos casos puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención pueden contener adicionalmente un estabilizador.

Ejemplos de sistemas de emulsión se describen en los documentos WO 95/17210, WO 99/11241 y WO 99/12565 que desvelan adyuvantes de emulsión basados en escualeno,  $\alpha$ -tocoferol, y TWEEN80, formulado opcionalmente con los inmunoestimulantes QS21 y/o 3D-MPL. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el adyuvante de la invención puede comprender adicionalmente más inmunoestimulantes, tales como LPS o derivados de los mismos y/o saponinas. Ejemplos de inmunoestimulantes adicionales se describen en el presente documento y/o en "Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volumen 6, Eds. Powell, M.F., y Newman, M.J., Plenum Press, Nueva York y Londres, ISBN 0-306-44867-X.

En 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 que se ha descrito anteriormente, opcionalmente con un esteroles (por ejemplo, colesterol). Adicionalmente la emulsión oleosa (opcionalmente una emulsión de aceite en agua) puede contener Span 85 y/o lecitina y/o tricapriliina. 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 la saponina (por ejemplo QS21) y/o el derivado de LPS (por ejemplo, 3D-MPL) estarán presentes en una dosis para seres humanos de la presente composición inmunogénica en el intervalo de 1  $\mu$ g-200  $\mu$ g, tal como 10-100  $\mu$ g, o 10  $\mu$ g-50  $\mu$ g por dosis. Normalmente, la emulsión oleosa (opcionalmente una emulsión de aceite en agua) comprenderá desde un 2 a 10 % de acetite metabolizable. Opcionalmente comprenderá de un 1 a 10 % de escualeno, de 2 a 10 % de alfa tocoferol y desde un 0,3 a 3 % (opcionalmente de un 0,4-2 %) de emulsionante (opcionalmente Tween 80 [monooleato de sorbitan polioxetilado]). Cuando están presentes escualeno y alfa tocoferol, opcionalmente la relación de escualeno: alfa tocoferol es igual o menor de 1, ya que esta proporciona una emulsión más estable. El Span 85 (trioleato de sorbitan) también puede estar presente a un nivel de un 0,5 a 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 el escualeno y una saponina (opcionalmente QS21) se incluyen, es beneficioso incluir también 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 una reducción del coste de fabricación, mejora la comodidad de la vacunación, y también mejora cuantitativa y cualitativamente el resultado de las respuestas inmunitarias, tal como una mejor producción de IFN- $\gamma$ . En consecuencia, el sistema de adyuvante de la presente invención comprende normalmente 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 nivel de reactogenicidad muy reducido. 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 un esteroles (por ejemplo, colesterol) se puede incluir también estando presente en una relación de saponina:esteroles como se ha descrito en el presente documento.

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

Una formulación particularmente potente de adyuvante (para la última combinación 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 los documentos WO 95/17210 o in WO 99/12565 (en particular la formulación adyuvante 11 del Ejemplo 2, Tabla 1).

Ejemplos de un agonista de TLR2 incluye un peptidoglicano o lipoproteína. Las imidazoquinolinas, tales como Imiquimod y Resiquimod son agonistas TLR7 conocidos. También se conocen un agonista de TLR que es un ARN de cadena sencilla (TLR8 en seres humanos y TLR 7 en ratones), mientras que un ARN de doble cadena y poli IC (ácido poliinosínico-policitidílico – un sintético comercial mimético de un ARN vírico), son

ejemplares de agonistas TLR3. El 3D-MPL es un ejemplo de un agonista TLR4 mientras que CPG es un ejemplo de un agonista TLR9.

La composición inmunogénica puede comprender un antígeno y una inmunoestimulante adsorbido 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 entonces el antígeno se adsorbe primero a la sal de aluminio seguido por la adsorción del estimulante 3D-MPL en las mismas partículas 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 por agitado a temperatura ambiente durante una hora. La suspensión de 3D-MPL se añade entonces al antígeno adsorbido y la formulación se incuba a temperatura ambiente durante una 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 el mezclado de las partículas metálicas separadas 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, se proporcionan vacunas por la presente invención y se caracterizan porque el inmunoestimulante está adsorbido en partículas de sal metálica que están sustancialmente libres de otro antígeno, y porque las partículas de sal metálica que tienen el antígeno adsorbido están sustancialmente libres de otro inmunoestimulante. En consecuencia, la presente invención proporciona una formulación de 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 adyuvante puede ser intermedia la cual, si se utiliza dicho adyuvante, es necesario 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 una sal metálica. Dicha sal metálica puede ser idéntica o similar a la sal metálica en la que se ha adsorbido el inmunoestimulante. Opcionalmente, la sal metálica es una sal de aluminio, por ejemplo, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

La presente invención proporciona adicionalmente 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 por que la primera y segunda partículas son partículas separadas.

Los derivados o mutaciones de LPS o LOS o derivados de lípido A que se describen en el presente documento se diseñan por ser menos tóxicos (por ejemplo, 3D-MPL) que los lipopolisacáridos nativos y son equivalentes intercambiables 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 en las composiciones de la invención comprenden un vehículo liposómico (producido por técnicas conocidas a partir de fosfolípidos (tales como el dioleoilfosfatidil colina [DOPC]) y opcionalmente un esteroil [tal como el colesterol]). Dichos vehículos liposómicos pueden albergar derivados del lípido A [tal como 3D-MPL – véase anteriormente] y/o saponinas (tales como QS21 – véase anteriormente). En una realización el adyuvante comprende (por dosis de 0,5 ml) 0,1-10 mg, 0,2-7, 0,3-5, 0,4-2, o 0,5-1 mg (por ejemplo, 0,4-0,6, 0,9-1,1, 0,5 o 1 mg) de fosfolípido (por ejemplo, DOPC), 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3, o 0,125-0,25 mg (por ejemplo, 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 o 0,125 mg) de esteroides (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 un 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 que se derivan de al menos todos los siguientes serotipos: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (y puede comprender también uno o más serotipos 3, 6A, 19A, y 22F), en el que el título de anticuerpo GMC inducido contra uno o más (o todos) los componentes vacunales 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F no es significativamente inferior a los inducidos por la vacuna Prevnar® en seres humanos vacunados.

En una realización el adyuvante utilizado para las composiciones de la invención comprende una emulsión de aceite en agua producida a partir de un aceite metabolizable (tal como escualeno), un emulsionante (tal como Tween 80) y opcionalmente un tocol (tal como 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) de 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) de tocol (tal como alfa tocoferol).

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

10 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 un esteroide (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 un 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 una saponina (por ejemplo, QS21).

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

20 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, 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 un derivado de lípido A (por ejemplo, 3D-MPL).

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

30 Las preparaciones vacunales que contienen 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 medio de una vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir la inyección por medio de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, o subcutánea; o por medio de la administración mucosa en los tractos oral y alimentario, respiratorio, genitourinario. La administración intranasal de las vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media es posible (ya que el transporte nasofaríngeo de neumococos puede evitarse más eficazmente, atenuando la infección de esta manera en su estadio más temprano). Aunque la vacuna de la invención se puede administrar como una dosis única, los componentes de la misma se pueden co-administrar juntos al mismo tiempo o en diferentes momentos (por ejemplo los conjugados de sacáridos neumocócicos se podrían administrar por separado, al mismo tiempo o 35 1-2 semanas tras la administración de cualquier componente proteico bacteriano de la vacuna para la coordinación óptima de las respuestas inmunitarias con respecto uno del otro). Para la co-administración, el adyuvante Th1 opcional puede estar presente en cada una o todas 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 sacarídicos se pueden administrar IM (o ID) y las proteínas bacterianas se pueden administrar IN (o ID). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar IM para las dosis de sensibilización e IN para las dosis de refuerzo.

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

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

55 Las vacunas o composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden almacenar en solución o liofilizadas. En una realización, se liofiliza la solución en presencia de 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 lioprotector amorfo, y un agente de volumen que proporciona una estructura mejor aglutinada tal como glicina o manitol. La presencia de un agente de volumen cristalino permite el acortamiento de 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, glucosa/manitol, manosa/manitol y maltosa/manitol. Normalmente, la relación molar de los dos constituyentes es opcionalmente 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.

Los agentes estabilizadores anteriores y las mezclas de agentes estabilizadores pueden incluir adicionalmente un polímero capaz de aumentar la temperatura de transición de cristalización (T<sub>g</sub>) de la formulación, tal como poli(vinilpirrolidona) (PVP), hidroxietil almidón o dextrano, o un polímero que actúa como un agente de volumen cristalino tal como polietilenglicol (PEG) por ejemplo que tengan un peso molecular de entre 1500 y 6000 y dextrano.

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

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 además comprende 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 descritas en la piel (ID) forma una realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula externa "queratinizada", llamada estrato córneo, que cubre la epidermis. Por debajo de esta epidermis hay una capa llamada dermis, que a su vez cubre el tejido subcutáneo. Los investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna en la piel, y en particular la dermis, estimula la respuesta inmunitaria, que se puede asociar también a varias ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en el presente documento constituye una característica opcional de la presente invención.

La técnica convencional de inyección intradérmica, el "procedimiento de Mantoux", comprende las etapas de limpiar la piel, y luego pellizcar la piel con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre estrecho (calibre 26-31) situando la aguja hacia arriba insertarla en un ángulo de entre 10-15 °. Una vez que se inserta el bisel de la aguja, el cono de la aguja se baja y se avanza adicionalmente mientras se proporciona una pequeña presión para elevarla bajo la piel. Entonces se inyecta el líquido muy lentamente formando de esta manera una ampolla o protuberancia en la superficie de la piel, seguido por una retirada lenta de la aguja.

Más recientemente, se han descrito dispositivos diseñados específicamente para administrar agentes líquidos en o a través de la piel, por ejemplo los dispositivos descritos en los documentos WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección por propulsión 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 el 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).

Cuando las vacunas de la presente invención se van a administrar en la piel, o más específicamente en la dermis, la vacuna está en un volumen líquido bajo, particularmente un volumen de entre aproximadamente 0,5 ml y 0,2 ml.

El contenido de antígenos en vacunas de la piel o intradérmicas de la presente invención puede ser similar a las dosis convencionales que se encuentran en las vacunas intramusculares (véase anteriormente). Sin embargo, una característica de las vacunas de la piel o intradérmicas que las formulaciones puedan tener una "dosis baja". En consecuencia, los antígenos proteicos en las vacunas de "dosis baja" se presentan opcionalmente de solo 0,1 a 10 µg o 0,1 a 5 µg por dosis; y los antígenos sacarídicos (opcionalmente conjugados) pueden estar presentes en el intervalo de 0,01- 1 µg, o entre 0,01 a 0,5 µg de sacárido por dosis.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "suministro intradérmico" significa el suministro de una vacuna en la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna no estar localizada necesariamente exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa de la piel que se localiza entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm de la superficie en la piel humana, pero hay una cierta variación en cantidad entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar que se alcance la dermis

penetrando 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 en último término solo o primariamente en la dermis, o puede en último término distribuirse en la epidermis y la dermis.

5 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 libre o conjugada. 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 más proteínas neumocócicas como proteínas libres o conjugadas de las composiciones conjugadas de *S. pneumoniae* de la invención. Dichas proteínas neumocócicas libres pueden ser las mismas o diferentes de cualquiera de las proteínas de *S. pneumoniae* que se utilizan como vehículos proteicos. Uno o más antígenos proteicos de *Moraxella catarrhalis* también pueden incluirse en la combinación vacunal en una forma libre o conjugada. Por lo tanto, la presente invención es un procedimiento mejorado para dar lugar a una respuesta inmunitaria (protectora) contra la otitis media en bebés.

10 15 En otra realización, la presente invención es un procedimiento mejorado para dar lugar a una respuesta inmunitaria (protectora) en bebés (definidos con de 0-2 años en el contexto de la presente invención) administrando una cantidad eficaz y segura de una vacuna de la invención [una vacuna pediátrica]. Otras realizaciones de la presente invención incluyen la provisión de composiciones de conjugados antigénicos de *S. pneumoniae* 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.

20 25 En otra realización más, la presente invención es un procedimiento mejorado para dar lugar a una respuesta inmunitaria (protectora) en una población anciana (en el contexto de la presente invención un paciente se considera anciano si tiene 50 años o más de edad, normalmente por encima de 55 años y más general mente por encima de 60 años) administrando una cantidad eficaz y segura de la vacuna de la invención, opcionalmente en conjunción con una o dos proteínas de *S. pneumoniae* presentes como proteína libre o conjugada, cuyas proteínas de *S. pneumoniae* libres pueden ser las mismas o diferentes de las proteínas de *S. pneumoniae* que se utilizan como vehículos proteicos.

30 Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para inmunizar un ser humano huésped contra una enfermedad producida por *S. pneumoniae* y opcionalmente la infección por *Haemophilus influenzae* que comprende la administración al huésped de una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención.

35 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 con *S. pneumoniae* y opcionalmente *Haemophilus influenzae*.

40 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 con *S. pneumoniae* y opcionalmente *Haemophilus influenzae*.

En un aspecto adicional, la enfermedad es cualquiera de o neumonía o enfermedad neumocócica invasiva (IPD) de seres humanos ancianos, exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) 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.

45 Las expresiones “que comprende”, “comprender” y “comprende” en el presente documento tienen la intención de los inventores de que se puedan sustituir opcionalmente con las expresiones “que consiste en”, “consistir en” y “consiste en”, respectivamente, en cada caso.

50 Las realizaciones en el presente documento que se refieren a “composiciones vacunales” de la invención también se pueden aplicar 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 tienen solamente fines de ilustración, y no se pretende que limiten el ámbito de la invención de ninguna manera.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Expresión de Proteína D

#### Proteína D de *Haemophilus influenzae*

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

##### 5 Materiales de partida

##### El ADN codificante de la proteína D

La proteína D está altamente conservada entre todos los serotipos y cepas no tipables de *H. influenzae*. Se obtuvo el vector pHIC348 que contenía la secuencia de ADN que codifica el gen de Proteína D completo gracias al 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 pMG1

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  $\lambda$  para la transcripción y traducción de genes ajenos insertados (Shatzman y col., 1983). Además, se intercambi6 el gen de resistencia a la ampicilina por el gen de resistencia a la kanamicina.

##### La cepa de *E. coli* AR58

La cepa de *E. coli* AR58 se gener6 por transducción de N99 con una materia prima de fago P1 cultivado previamente en un derivad SA500 (galE::TN10, lambdakil<sup>-</sup> cl857  $\Delta$ H1). N99 y SA500 son cepas *E. coli* K12 derivadas del laboratorio del Dr. Martin Rosenberg en el Instituto Nacional de la Salud.

##### El vector de expresión pMG1

Para la producción de la proteína D, el ADN que codifica la proteína se clon6 en el vector de expresión pMG1. Esta plásmidos 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 *E. coli* lisogénico para estabilizar el ADN plasmídico. Las cepas huésped lisogénicas contienen el ADN del fago lambda deficiente en replicación integrado en el genoma (Shatzman y col., 1983). El ADN del fago lambda cromosómico dirige la síntesis de la proteína represora cl que se une al represor OL del vector y evita la unión de la ARN polimerasa al promotor PL y de esta manera la transcripción del gen insertado. El gen cl de la cepa de expresión AR58 contiene un mutante sensible a la temperatura de manera que la transcripción dirigida por PL se puede regular por un cambio de temperatura, es decir, un aumento en la temperatura de cultivo inactiva el represor y la síntesis de la proteína ajena se inicia. Este sistema de expresión permite la síntesis controlada de proteínas ajenas especialmente las que pueden ser tóxicas para la célula (Shimatata y Rosenberg, 1981).

##### La cepa AR58 de *E. coli*

La cepa AR58 lisogénica de *E. coli* que se utiliza para la producción del vehículo proteico D es un derivado de la cepa N99 de *E. coli* K12 NIH (F<sup>-</sup> su<sup>-</sup> galK2, lacZ<sup>-</sup> thr<sup>-</sup>). Contiene un fago lambda lisogénico deficiente (galE::TN10, lambdakil<sup>-</sup> cl857  $\Delta$ H1). El fenotipo Kil<sup>-</sup> evita el silenciamiento de la síntesis macromolecular del huésped. La mutación cl857 confiere una lesión sensible a la temperatura del represor cl. La eliminación  $\Delta$ H1 retira el oper6n derecho del fago lambda y los loci del huésped bio, uvr3, y chlA. La cepa AR58 se gener6 por transducción de N99 con un fago materia prima P1 cultivado previamente en un derivado de SA500 (galE::TN10, lambdaKil<sup>-</sup> cl857  $\Delta$ H1). La introducción del lisogén deficiente en N99 se seleccion6 con tetraciclina gracias a la presencia de un transpos6n TN10 que codifica la resistencia a la tetraciclina en el gen galE adyacente.

##### Construcción del vector pMGMDPPrD

El vector pMG1 que contienen el gen que codifica la proteína S1 no estructural del virus de influenza (pMGNS1) se utiliz6 para construir el pMGMDPPrD. El gen de la proteína D se amplific6 por PCR a partir del vector pHIC348 (Janson y col., 1991 Infect. Immun. 59:119-125) con los cebadores de PCR que contenían los 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 contenía los 81 aminoácidos del extremo N de la proteína NS1 seguido por la proteína PD. Este vector se etiquet6 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 de ADN elimina la región codificante NS1, excepto los tres primeros tres restos del extremo N. Al re-unir en el vector un gen que codifica una proteína de fusión con la siguiente secuencia de aminoácidos del extremo N se generaba:

5 ---- MDP SSHSSNMANT --- NS1 Proteína D

La proteína D no contiene péptido líder o cisteína en el extremo N al cual se fijan normalmente las cadenas lipídicas. La proteína por lo tanto ni se excreta en el 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 codificaba la proteína D se demostraba por digestión del ADN plasmídico aislado con endonucleasas seleccionadas. Se hace referencia a la cepa recombinante de *E. coli* como ECD4.

15 La expresión de la proteína D está bajo el control del promotor PL lambda/Operador OL. La cepa huésped AR58 contiene un gen *cl* sensible a la temperatura en el genoma que bloquea la expresión de PL lambda a baja temperatura uniéndose a OL. Una vez que se eleva la temperatura se libera el *cl* del OL y la proteína D se expresa.

#### *Preparación a pequeña escala*

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

20 La extracción de células recolectadas y la purificación de proteína D se llevó a cabo de la siguiente manera. El aglomerado del cultivo celular congelado se descongeló y se re-suspendió en una solución de destrucción celular (tampón citrato pH 6,0) a una  $DO_{650} = 60$  final. La suspensión se pasó dos veces a través de un homogeneizador de alta presión a una  $P = 1000$  bar. El homogenado de cultivo celular se clarificó por centrifugación y se eliminaron los desechos celulares por filtración. En la primera etapa de purificación el lisado filtrado se aplica a 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 por una etapa de aumento de la fuerza iónica del tampón de elución.

25 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 en el gel y se puede recolectar en el flujo continuo.

30 En ambas etapas de columnas de cromatografía la fracción recolectada se controla por DO. El flujo continuo de la cromatografía en columna de intercambio aniónico que contenía la proteína D purificada se concentra por ultrafiltración.

La proteína D que contenía el retenido de la ultrafiltración se pasa finalmente por una membrana de 0,2 mm.

#### *Preparación a gran escala*

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

40 En la primera etapa de purificación el homogenado de cultivo celular se diluye y se aplica a 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 continuo.

45 En ambas etapas de cromatografía en columna la recolección se controla por DO. El flujo continuo de la cromatografía en columna de intercambio aniónico contiene la proteína D purificada se concentra y se diafiltra por ultrafiltración.

La proteína D contenida en el retenido de ultrafiltración se pasa finalmente a través de una membrana de 0,2 mm.

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

50 La proteína PhtD es un miembro de la familia de proteínas de tríadas de histidina neumocócica (Pht) que se caracteriza por tríadas de histidina (motivo HXXHXHX). La PhtD es una molécula de 838 aa y tiene 5 tríadas de histidina (véase MedImmune WO00/371105 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 medio (posiciones de aminoácidos 348-380). La PhtD tiene una secuencia de señal en el extremo N de 20 a con un motivo LXXC.

### Construcción genética

5 La secuencia genética de la proteína PhtD MedImmune (desde el aa 21 al aa 838) se transfirió recombinantemente a *E. coli* utilizando un vector doméstico pTCMP14 que portaba el promotor pλ. La cepa huésped *E. coli* es AR58, que alberga el represor termosensible cI857, que permite la inducción por calor del promotor.

10 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 tenían cada uno los sitios de restricción *NdeI* y *KpnI* o el *KpnI* y *XbaI*. Estos cebadores no se hibridan con cualquier nucleótido del vector sino solo con las secuencias específicas del gen *phtD*. Un codón de inicio ATG artificial se insertó utilizando el primer cebador que tiene 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. Se llevó a cabo entonces la subclonación de los fragmentos en el vector de expresión TCMP14 utilizando técnicas convencionales y el vector se transformó en *E. coli* AR58.

### Purificación de PhtD

20 La purificación de PhtD se consiguió de la siguiente manera:

- Cultivo de las células de *E. coli* en presencia de kanamicina: cultivo de 30 horas a 30°C, luego inducción durante 18 horas a 39,5°C.
- Destrucción de células *E. coli* del cultivo completo a una DO de 6115 en presencia de EDTA 5 mM y PMSF 2 mM como inhibidores de proteasa: Rannie, 2 pasajes, 1000 bares.
- 25 □ Captura de antígenos y eliminación de desechos celulares sobre cromatografía XL Q Streamline en modo de lecho expandido a temperatura ambiente (20°C); la columna se lavó con NaCl 150 mM + Empigen 0,25 % pH 6,5 y se eluyó con NaCl 400 mM + Empigen 0,25 % en 25 mM de tampón de fosfato potásico pH 7,4.
- Filtración en un cartucho Sartobran 150 (0,45 + 0,2 mm)
- 30 □ Unión del antígeno con cromatografía sobre Sepharose FF IMAC quelante de Zn<sup>++</sup> a pH 7,4 en presencia de 5 mM de imidazol a 4°C; la columna se lava con imidazol 5 mM y Empigen al 1 % y se eluye 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 (25 mM de fosfato potásico) a 4°C; la columna se lavó con 140 mM de NaCl y se eluyó a 200 mM de NaCl mientras que los contaminantes (proteínas y ADN) se mantuvieron adsorbidos en el intercambiador.
- 35 □ Concentración y ultrafiltración con 2 mM de Na/fosfato K pH 7,15 sobre una membrana de 50 kDa.
- Esterilización por filtración del volumen purificado en un cartucho filtrante Millipak-20 0,2 mm.

### Ejemplo 1c: Expresión de pneumolisina

40 La pneumolisina neumocócica se preparó y detoxicó como se describe en los documentos WO2004/081515 y WO2006/032499.

### Ejemplo 2:

#### Preparación de conjugados

45 Es bien conocido en la técnica cómo fabricar polisacáridos neumocócicos purificados. Para los fines de estos ejemplos, los polisacáridos se produjeron esencialmente como se describe en el documento EP072513 o por procedimientos estrechamente relacionados. Antes de la conjugación los polisacáridos se tienen que modificar de tamaño por microfluidización como se describe posteriormente.

50 Las condiciones de activación y acoplamiento son específicas de cada polisacárido. Estas se dan en la Tabla 1. El polisacárido modificado de tamaño (excepto pS5, 6B y 23F) se disolvió en NaCl 2M, NaCl 0,2 M o en agua para inyección (WFI). Se evaluó la concentración óptima de polisacárido para todos los serotipos. Todos los serotipos excepto el serotipo 18C se conjugaron directamente al vehículo proteico como se detalla



posteriormente. Se hicieron dos conjugados alternativos con el serotipo 22F; uno conjugado directamente, el otro por medio de un engarce ADH.

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

#### Preparación de 18C:

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

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

20 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 se completó la disolución del espaciador, se ajustó el pH a 6,2. Se añadió entonces 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 el pH de regulación. 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 eliminar la ADH residual y el reactivo EDAC.

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

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

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

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

30 La solución CDAP (100 mg/ml de acetonitrilo/WFI 50/50 v/v recién preparado) se añadió hasta alcanzar la relación CDAP/PS apropiada.

El pH se elevó a pH de activación 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>.

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

35 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 durante una noche a 2-8°C con agitado continuo lento.

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

40 En un segundo procedimiento de conjugación para este sacárido (el primero era el procedimiento de conjugación directa PS22-PhtD que se muestra en la Tabla 1), el 22F se unió al vehículo proteico por medio de un engarce – dihidracida de ácido adípico (ADH). El polisacárido serotipo 22F se microfluidizó antes de la conjugación.

#### **Derivación PS 22F**

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

El PS22F microfluidizado 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 0,1 N.

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

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

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

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

Acoplamiento

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

- 15 Antes de la elución en Sephacryl S400HR, el conjugado se clarificó utilizando un filtro Minisart de 5 mm.

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

Purificación de los conjugados:

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

- 25 Las fracciones que contienen los conjugados se detectaron por UV<sub>280 nm</sub>. Las fracciones se agruparon de acuerdo con su K<sub>d</sub>, se esterilizaron por filtración (0,22 µm) y se almacenaron a +2-8°C. Se determinaron las relaciones PS/Proteína en las preparaciones de conjugado.

**Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados de PS de *S. pneumoniae* con Proteína D/TT/DT/PhtD/Ply**

- 30 Cuando aparece “µfluid” en una línea de cabecera, indica que el sacárido se modificó de tamaño por microfluidización antes de la conjugación. Los tamaños de sacáridos después de la microfluidización se dan en la Tabla 2.

**Tabla 1 Condiciones específicas de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados de PS de *S. pneumoniae* con Proteína D/TT/DT/PhtD/Ply**

Serotipo	1 µfluid	4 µfluid	5	6A	6B	7F µfluid
Conc. de PS (mg/ml)	2,5	2,5	7,1	5,0	5,0	5,0
Disolución de PS	WFI	WFI	WFI	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Conc. de PD (mg/ml)	10,0	10,0	5,0	5,0	5,0	10,0
Relación Inicial PD/PS (p/p)	1,5/1	1,5/1	1/1	1/1	1,1/1	1,2/1
Conc. de CDAP (mg/mg PS)	0,50	0,50	0,79	0,83	0,83	0,75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0

Serotipo	9V $\mu$ fluid	14 $\mu$ fluid	18C $\mu$ fluid	19A $\mu$ fluid	19F $\mu$ fluid	22F $\mu$ fluid	23F
Conc. de PS (mg/ml)	5,0	5,0	4,5	15,0	9,0	6,0	2,38
Disolución de PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 0,2 M	NaCl 2 M
Conc. de vehículo proteico (mg/ml)	10,0	10,0	20,0 (TT)	10,0 (Ply)	20,0 (DT)	10,0 (PhtD)	5,0
Relación Inicial vehículo proteico/PS (p/p)	1,2/1	1,2/1	2/1	2,5/1	1,5/1	3/1	1/1
Conc. de CDAP. (mg/mg PS)	0,50	0,75	0,75	1,5	1,5	1,5	0,79
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</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	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0

Nota: pH<sub>a</sub>,c,q 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 en polisacárido ( $\mu$ g/ml) se midió por el ensayo de Resorcinol y el contenido proteico ( $\mu$ g/ml por el ensayo de Lowry. La relación PS/PD (p/p) se determina por la relación de las concentraciones.

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

Se determinó el contenido en polisacárido libre de los conjugados que se mantenían a 4°C o almacenados días a 37 °C en el sobrenadante obtenido tras la incubación con anticuerpos anti vehículo proteico  $\alpha$  y sulfato amónico saturado, seguido por una centrifugación.

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

**Antigenicidad:**

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

**Contenido en proteína libre (%):**

15 El vehículo proteico sin conjugarse puede separarse del conjugado durante la etapa de purificación. El contenido de proteína residual libre se determinó utilizando una cromatografía de exclusión por tamaño (TSK 5000-PWXL) seguido por una detección con UV (214 nm). Las condiciones de elución permitían la separación del vehículo proteico libre y el conjugado. Se determinó entonces el contenido en proteína libre en los volúmenes conjugados frente a una curva de calibración (desde 0 a 560  $\mu$ g/ml de vehículo proteico).

20 El vehículo proteico libre en T se obtenía de la siguiente manera: % vehículo libre = (vehículo libre ( $\mu$ g/ml) / (concentración total del correspondiente vehículo proteico medido por Lowry ( $\mu$ g/ml) \* 100 %).

**Estabilidad:**

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

25 La caracterización 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.

**Conclusión:**

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

TABLA 2 – Características de los conjugados

Conjugados	Tamaño de PS (Dax10 <sup>3</sup> )	Relación Vehículo/PS	PS libre (Elisa)	Vehículo libre	Antigenicidad de PS (Elisa)	Tamaño de Conj. (kDa)
PS1-PD	349-382*	1,5-1,6	1,0 %-1,2 %	3,9 %-4,8 %	87 %-95 %	1499-1715
PS4-PD	93-100*	1,5-1,6	4,7-6,5 %	3,2 %-4,0 %	90 %-96 %	1303-1606
PS5-PD***	367-443	0,80	8,7-11,2 %	2,2 %-3,8 %	93 %-108 %	1998-2352
PS6A-PD	1100-1540	0,61	4,5 %	No hecho	45,9 %	No hecho
PS6B-PD***	1069-1391	0,7-0,8	1,3-1,6 %	<2,0 %	68 %-75 %	4778-5235
PS7F-PD	255-264*	1,1-1,2	<1 %	<1,4 %	58 %	3907-4452
PS9V-PD	258-280*	1,3-1,5	<1 %	<1,3 %	67 %-69 %	9073-9572
PS14-PD	232-241*	1,4	<1 %	<1,5 %	70 %	3430-3779
PS18C-TT''	89-97*	2,2-2,4	1,5-2,2 %	<4 %	46 %-56 %	5464-6133
PS19A-Ply*	151	3,2	<1 %		29 %	
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	No hecho	37 %	No hecho
PS22F-AHPhtD*159-167		3,66-4,34	<1 %	No hecho	28-31 %	No hecho
PS23F-PD***	914-980	0,5	1,4-1,9 %	3,7 %-4,9 %	137 %-154 %	2933-3152

\* Tamaño de PS después de la microfluidización del PS nativo

5

Se produjo una vacuna de 10 valencias mezclando los 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 un ser humano). Se produjo una vacuna de 11 valencias añadiendo además el conjugado del serotipo 3 de la Tabla 5 (por ejemplo, a 1 µg de sacárido por dosis para un ser humano). Se produjo una vacuna de 13 valencias añadiendo además los conjugados de serotipos 19A y 22F anteriores (con el 22F unido bien directamente a PhtD, o alternativamente mediante un engarce ADH) [por ejemplo, a una dosis de 3 µg de cada uno de los sacáridos por dosis para un ser humano]. Se produjo 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 un ser humano].

10

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

Diseño del estudio

El estudio utilizaba una vacuna 11Pn-PD – que comprendía los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugado cada uno con proteína D de *H. influenzae* (a los que se hace referencia en la Tabla 5 del Ejemplo 4). Los sujetos se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos para recibir cuatro dosis de cualquiera de la vacuna 11 Pn-PD o Havrix a aproximadamente 3, 4, 5 y 12-15 meses de edad. Todos los sujetos recibieron la vacuna Infanrix-hexa de GSK Biologicals (DTPa-HBV-IPV/Hib) concomitantemente a los 3, 4 y 5 meses de edad. La vacuna Infanrix-hexa es una combinación de Pediarix y Hib mezcladas antes de la administración. El seguimiento de la eficacia para el análisis "Según el Protocolo" comenzó 2 semanas después de la administración de la tercera dosis de vacuna y continuó hasta los 24-27 meses de edad. Se evaluó el transporte nasofaríngeo de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en un subgrupo seleccionado de sujetos.

20

25

Los padres se advirtieron de que consultaran al investigador si su hijo estaba enfermo, tenía dolor de oídos, perforación espontánea de la membrana timpánica o descarga ótica espontánea. Si el investigador

30

sospechaba de un episodio de AOM, el niño se remitía inmediatamente a un especialista de oídos, nariz y garganta (ENT) para la confirmación del diagnóstico.

- 5 Un diagnóstico clínico de AOM se basaba en la apariencia visual de la membrana timpánica (es decir, enrojecimiento, abultamiento, pérdida de reflejo de la luz) o la presencia de descarga de fluido de oído medio (como se demuestra por una otoscopia simple o neumática o por microscopía). Además, al menos dos de los siguientes signos o síntomas tenían que estar presentes: dolor de oídos, descarga ótica, pérdida de audición, fiebre, letargia, irritabilidad, anorexia, vómitos, o diarrea. Si el especialista ENT confirmaba el diagnóstico clínico, se recolectaba un espécimen del fluido de oído medio por timpanocentesis para el ensayo bacteriológico.
- 10 Para los sujetos que repetían la visita enfermos, se consideraba que había comenzado un nuevo episodio de AOM si habían pasado más de 30 días desde el principio del episodio anterior. Además, se consideraba que un episodio de AOM era un nuevo episodio bacteriano si el serotipo de la bacteria aislada era diferente del aislado previo cualquiera que fuera el intervalo entre los dos episodios consecutivos.

#### Resultados del ensayo

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

#### Episodios clínicos y definición de los casos de AOM

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

- 20 La Tabla 3 presenta la eficacia protectora de la vacuna 11Pn-PD y ambas vacunas 7-valentes 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 AOM y AOM causado por diferentes serotipos de neumococos, *H. influenzae*, NTHi y *M. catarrhalis*.

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

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

- 30 Otro hallazgo importante en el estudio actual es el 35,6 % de protección proporcionado por la vacuna 11Pn-PD contra la AOM causada por *H. influenzae* (y especialmente un 35,3 % de protección proporcionada por NTHi). Esta hallazgo es de principal significación clínica, debido al aumento de la importancia de *H. influenzae* como una causa principal de AOM en la vacuna de conjugado neumocócico. En línea con la protección proporcionada contra AOM, la vacuna 11Pn-PD también reducía la presencia nasofaríngea de *H. influenzae* después de la dosis de refuerzo el segundo año de edad. Estos hallazgos contrastan con las observaciones previas en Finlandia, donde se observó, para ambas vacunas conjugadas neumocócicas 7-valentes, un aumento de los episodios de AOM debidos a *H. influenzae*, (Eskola y col., y Kilpi y col.) como prueba de la sustitución etiológica.
- 35

- No se podía establecer una clara correlación entre la protección contra los episodios de AOM debidos Hi y los niveles de anticuerpos contra el vehículo proteico D, y las concentraciones de anticuerpos IgG anti-PD post-primarias en los vacunados con 11Pn-PD, que se mantenían libres de episodios de AOM-Hi, eran esencialmente los mismos que los niveles de anticuerpos IgG anti-PD post-primarios medidos en los vacunados con 11Pn-PD que desarrollaban al menos un episodio de AOM Hi durante el periodo de seguimiento de la eficacia. Sin embargo, aunque no se pudo establecer la correlación entre el impacto biológico de la vacuna y la inmunogenicidad para IgG anti-PD post-primaria, es razonable asumir que el vehículo proteico PD, que está altamente conservado entre las cepas de *H. influenzae*, ha contribuido en gran manera a la inducción de la producción contra Hi.
- 40
- 45

- El efecto sobre la enfermedad de AOM se acompañaba por un efecto sobre la presencia nasofaríngea que era de similar magnitud para la vacuna de serotipos neumocócicos y *H. influenzae* (Figura 1). Esta reducción de la presencia nasofaríngea de *H. influenzae* en los vacunados con el conjugado PD apoya la hipótesis de un efecto protector directo de la vacuna del conjugado-PD contra *H. influenzae*, incluso si la eficacia protectora no se podía correlacionar con las respuestas inmunitarias de IgG anti-PD según se mide por ELISA.
- 50

- En el siguiente ejemplo se utilizó un modelo de otitis media de chinchilla con agrupamientos de sueros de los niños inmunizados con la formulación 11-valente de este ejemplo o con la vacuna 10-valente del Ejemplo 2 (véase también las Tablas 1 y 2 y los comentarios por debajo) Ambos agrupamientos inducen una reducción significativa del porcentaje de animales con otitis media respecto al agrupamiento de sueros pre-inmunes.
- 55

No hay una diferencia significativa entre los agrupamientos inmunes de 10 y 11-valentes. Esto demuestra que ambas vacunas tienen un potencial similar para inducir protección contra la otitis media producida por una *H. influenzae* no tipable en este modelo.

Tabla 3

Tipo de episodio de AOM	11Pn-PD						Prevnar en FinOM (Eskola y col.)						7v-OMP in FinOM (Kilip y col.)					
	n		VE		n		VE		n		VE		n		VE			
	11Pn-PD	Control	%	LL	UL	7v-CRM	Control	%	LL	UL	7v-OMP	Control	%	LL	UL			
N	2455	2452				786	794			805	794							
cualquier AOM	333	499	33,6	20,8	44,3	1251	1345	6	-4	16	1364	1345	-1	-12	10			
Cualquier AOM con MEF	322	474	32,4	19,0	43,6	1177	1267	7	-5	17	1279	1267	0	-12	10			
Cultivo confirmado de neumococos	92	189	51,5	36,8	62,9	271	414	34	21	45	314	414	25	11	37			
Serotipos neumocócicos vacunales(*)	60	141	57,6	41,4	69,3	107	250	57	44	67	110	250	56	44	66			
Otros patógenos bacterianos																		
<i>H. influenzae</i>	44	68	35,6	3,8	57,0	315	287	-11	-34	8	315	287	-9	-32	10			
<i>H. influenzae</i> 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 ATP; n = número de episodios  
 \*Serotipos neumocócicos vacunales: para 11 Pn-PD = 11 serotipos, para Pevnar y 7v-OMP = 7 serotipos MEF = Fluido de oído medio

**Ejemplo 4:****Selección de vehículo proteico para el serotipo 19F**

Ensayo ELISA utilizado

5 El procedimiento de ELISA de inhibición se basa esencialmente en un ensayo propuesto en 2001 por Concepcion y Frasch y que fue expuesto por Henckaerts y col., 2006, *Clinical and Vaccine Immunology* 13:356-360. En resumen, los polisacáridos neumocócicos purificados se mezclaron con seroalbúmina humana metilada y se adsorbió 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 fetal bovino (FBS) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente con agitado. Las muestras de suero se diluyeron en PBS que contenía un 10 %  
10 de FBS, 10 µg/ml de polisacáridos 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 tampón. Se trató de cada manera una referencia interna calibrada contra el suero convencional 89-SF utilizando concentraciones de IgG específicas de serotipo en 89-SF y se incluyó en cada placa. Tras el lavado, los anticuerpos unidos se detectaron utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IgG humana 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 un único componente tetrametilbencidina listo para su uso del kit de sustrato de inmunoensayo de enzima peroxidasa (BioRad, Hercules, CA, US) en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se paró con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 calcularon referenciando los puntos de densidad  
20 óptica en los límites definidos respecto a la curva de referencia interna del suero, que se modelizó por una ecuación log logística de 4 parámetros calculada con el software SoftMax Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El punto de corte del 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 opsono-fagocitosis

25 En el encuentro consultivo de la OMS en junio de 2003, se recomendaba el uso de un ensayo OPA como se establece 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 se incluyeron 11Pn-PD&Di-001 y 11Pn-PD&Di-007, tres formulaciones vacunales 11-valentes (Tabla 4) en las que se conjugaban 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 para los estudios de 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 anticuerpos anti-neumocócicos y actividad 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 anticuerpos por ELISA de 22F y los porcentajes de los sujetos que alcanzan el umbral de 0,2 µg/ml antes y después la vacunación de refuerzo 23-valente solo de polisacárido.

40 La actividad de opsono-fagocitosis se mostraba claramente mejorada para los anticuerpos inducidos con estas formulaciones 19F-DT como se demostraba por las tasas de seropositividad más altas (títulos de opsono-fagocitosis ≥ 1:8) y GMT OPA un mes después de la vacunación primaria (Tabla 9). Un mes tras la vacunación de refuerzo 23-valente con solo polisacárido, la actividad de opsono-fagocitosis de los anticuerpos 19F se mantenía significativamente mejor para 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 con 11Pn-PD en niños en edad de comenzar a caminar sensibilizados previamente con conjugados 19F-DT o 19F-PD en comparación con una 4ª dosis consecutiva de Prevnar®. Dados los casos de penetración expuestos tras la introducción de Prevnar® en los EE. UU., la mejora de la actividad de opsono-fagocitosis contra el serotipo 19F cuando se conjuga con el vehículo proteico DT puede ser una ventaja para las vacunas candidatas.

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



**Tabla 4. Formulaciones vacunales neumocócicas conjugadas que se utilizan en estudios clínicos.**

Formulación	Serotipo neumocócico µg/vehículo proteico											Al <sup>3+</sup> mg
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F	
11Pn-PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	< 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
19F-DT Form. 3	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. de PS (mg/ml)	1,5	2	2,0	7,5	5,5	3,0
Disolución PS	NaCl 150 mM	NaCl 2 M	WFI	WFI	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Conc. de PD(mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Relación Inicial de 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>q</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. de PS (mg/ml)	1,75	2,5	1,75	4,0	2,5
Disolución PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	WFI	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Conc. de PD(mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Relación Inicial de 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>q</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 de activación/acoplamiento/inactivación de conjugados de Proteína D de *S. pneumoniae*/DT para el estudio de 11 Pn-PD&Di-001**

Serotipo	1 µfluid	3 µfluid	4 µfluid	5 µfluid	6B µfluid	7F Nativo
Conc. de 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. de PD(mg/ml)	10,0	5,0	5,0	5,0 NaCl 2 M	20 (DT) NaCl 2 M	5,0
Relación Inicial de PS/PD (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>q</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. de 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. de PD(mg/ml)	5,0	5,0	5,0	20 (DT)	10 (DT)
Relación Inicial de PS/PD (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>q</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 Proteína D de *S. pneumoniae*/DT para el estudio 11 Pn-PD&Di-007**

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

(continuación)

Serotipo	1 Nativo	3 µfluid	4 Nativo	5 Nativo	6B Nativo	7F µfluid
Conc. de PD(mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5	10
Relación Inicial de PS/PD (p/p)	0,7/1	1/1	1	1/1	1/1	1,2/1
Conc. CDAP (mg/mg PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pHa=pHc=pHq	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. de PS (mg/ml)	5,0	5,0	1,75	9,0	10,0	9,5
Disolución PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	WFI	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Conc. de PD(mg/ml)	10	10,0	5,0	20 (DT)	5,0 (PD)	10
Relación Inicial de PS/PD (p/p)	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
pHa=pHc=pHq	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0
Tiempo de acoplamiento	60 min	60 min	45 min	120 min	120 min	60 min

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

(continuación)

Grupo	11Pn-PD&Di-001 (22F-ELISA)			11Pn-PD&Di-007 (22F-ELISA)		
	N	% ≥ 0,20 µg/ml (95 % CI)	GMC (µg/ml) (95 % CI)	N	% ≥ 0,20 µg/ml (95 % CI)	GMC (µg/ml) (95 % CI)
<i>Prevnar</i>	148	98,6 (95,2-99,8)	2,98 (2,60-3,41)	41	97,6 (87,1-99,9)	2,91 (2,15-3,94)

† La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

**Tabla 9. Porcentaje de sujetos con un título de OPA 19F ≥ 0,20 mg/ml y media geométrica de concentraciones de anticuerpo 19F (GMC con un 95 % CI; mg/ml) un mes después de la vacunación primaria con 1 µg de 19F-PD, 3 µg de 19F-DT o *Prevnar* (2 µg 19F-CRM) (Cohorte total)**

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

† La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

**Tabla 10. Porcentaje de sujetos con una concentración de anticuerpo 19F ≥ 0,20 µg/ml y GMC de anticuerpo 19F (µg/ml) antes y al mes siguiente del refuerzo 23-valente con solo polisacárido en niños sensibilizados con 1 µg de 19F-PD, 3 µg de 19F-DT o *Prevnar* (2 µg 19F-CRM) (Cohorte total)**

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

† La composición de las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

**Tabla 11. Porcentaje de sujetos con un título de OPA 19F  $\geq$  1:8 y GMT de OPA 19F antes y al menos siguientes del refuerzo 23-valente solo con polisacárido en niños sensibilizados con 1  $\mu$ g de 19F-PD, 3  $\mu$ g de 19F-DT o *Prevnar* (2  $\mu$ g 19F-CRM) (Cohorte total)**

Grupo Primario	11Pn-PD&Di-002					
	Antes de la vacunación de refuerzo			Un mes tras el refuerzo 23-valente con PS		
	N	% $\geq$ 1:8 (95 % CI)	GMT (95 % CI)	N	% $\geq$ 1:8 (95 % CI)	GMT (95 % CI)
11Pn-PD	29	27,6 (12,7-47,2)	10,9 (5,0-23,7)	28	82,1 (63,1-93,9)	408,0 (157,3-1058,3)
19F-DT Form. 1 <sup>r</sup>	19	47,4 (24,4-71,1)	18,1 (7,2-45,7)	18	94,4 (72,7-99,9)	1063,8 (386,6-2927,5)
19F-DT Form. 2 <sup>r</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>Pprevnar</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 las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

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

Grupo Primario	11Pn-PD&Di-002					
	Ensayo 22F-ELISA			Ensayo OPA		
	N	% $\geq$ 0,20 $\mu$ g/ml (95 % CI)	GMC ( $\mu$ g/ml) (95 % CI)	N	$\geq$ 1:8 (95 % CI)	GMT (95 % CI)
11Pn-PD	70	100 (94,9-100)	4,52 (3,7-5,5)	21	100 (83,9-100)	255,6 (135,5-481,9)
19F-DT Form. 1 <sup>r</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>r</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>Pprevnar</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 las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

**Tabla 13. Porcentaje de sujetos con concentraciones de anticuerpo  $\geq$  0,2  $\mu$ g/ml, OPA  $\geq$  1:8 y GMC/GMT contra neumococos 19A un mes después de la vacunación primaria con 1  $\mu$ g de 19F-PD, 3  $\mu$ g de 19F-DT o *Pprevnar* (2  $\mu$ g 19F-CRM) (Cohorte total)**

Grupo	11Pn-PD&Di-001					
	Ensayo 22F-ELISA			Ensayo de OPA		
	N	% $\geq$ 0,20 $\mu$ g/ml (95 % CI)	GMC ( $\mu$ g/ml) (95 % CI)	N	$\geq$ 1:8 (95 % CI)	GMT (95 % CI)
11Pn-PD	45	28,9 (16,4-44,3)	0,09 (0,07-0,11)	52	7,7 (2,1-18,5)	5,2 (4,0-6,8)
19F-DT Form 2 <sup>r</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>Pprevnar</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 las diferentes formulaciones se proporciona en la Tabla 4.

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

5 Para optimizar la respuesta desencadenada por las vacunas neumocócicas conjugadas en la población anciana, GSK formuló una vacuna con polisacáridos (PS) conjugados 11-valentes con un nuevo adyuvante, el adyuvante C – véase posteriormente.

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

10 En ambas formulaciones vacunales, los conjugados de PS 11-valentes se componían 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 la dosis de la dosis para seres humanos de la vacuna (5 µg de cada sacárido por dosis para seres humanos excepto 6B [10 µg]) conjugados de acuerdo con las condiciones de la Tabla 6 (Ejemplo 4), excepto 19F que se hizo de acuerdo con las siguientes condiciones del procedimiento CDAP: el sacárido con modificación de tamaño a 9 mg/ml, PD a 5 mg/ml, una relación PD/PS inicial de 1,2/1, una concentración de CDAP de 0,75 mg/mg PS, pHa = pHc = pHq 9,0/9,0/9,0 y un tiempo de acoplamiento de 60 min.

Los niveles por ELISA de IgG anti-PS y los títulos de opsono-fagocitosis se midieron en el suero recolectado el día 42. La frecuencia de linfocitos B de memoria anti-PS3 se midió por Elispot a partir de células de sangre periférica recolectadas el día 42.

20 De acuerdo con los resultados que se muestran en el presente documento posteriormente, el Adyuvante C mejoraba la inmunogenicidad de los conjugados de PS 11-valentes con AIPO4 en monos ancianos. El nuevo adyuvante aumentaba las respuestas de IgG a los PS (Figura 1) y los títulos de anticuerpo opsono-fagocitosis (Tabla 14). También existía la prueba que lo apoyaba de que la frecuencia de linfocitos B de memoria específicos de PS3 estaba aumentada con el uso de Adyuvante C (Figura 2).

25

Tabla 14, Inmunogenicidad del Conjugado en monos Rhesus ancianos (títulos de opsonofagocitosis post-II)

	PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7F	PS9V	PS14	PS18C	PS19F	PS23F
11-valente APO4	<8	5	<8	5	<8	16	<8	<8	<8	<8	<8
	8	181	64	49	64	4096	42	37	169	64	<64
11 valente Ady-C	5	9	<8	5	8	37	<8	<8	<8	<8	<8
	776	1351	891	676	6208	16384	111	161	7132	2048	<64

**Elispot de linfocitos B**

El principio del ensayo se basa en el hecho de que los linfocitos B maduran a 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 enumeran utilizando el ensayo Elispot de linfocitos B. El número de células plasmáticas refleja la frecuencia de células B de memoria al principio del cultivo.

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

En el presente estudio, los polisacáridos se utilizaron para revestir las placas de cultivo con el fin de hacer el recuento de los linfocitos B de memoria respectivos. Los resultados se expresan como una frecuencia de linfocitos B de memoria específicos de PS por cada millón de linfocitos B de memoria.

El estudio muestra que el Adyuvante C puede ser capaz de aliviar el problema del refuerzo de PS3 (véase 5<sup>o</sup> International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, 2-6 de Abril de 2006, Alice Springs, Australia Central. 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 pneumolisina detoxicada (dPly) como vehículo proteico para aumentar la inmunogenicidad del PS 19F en ratones Balb/c jóvenes**

Se inmunizaron grupos de 40 hembras de ratones Balb/c (de 4 semanas de edad) IM los días 0, 14 y 28 con 50 µl de PS solo 4-valente o PS conjugado con dPly 4-valente, ambos mezclados con adyuvante C.

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 ELISA de IgG anti-PS se midieron en sueros recolectados el día 42.

La respuesta anti-PS19F, que se muestra como un ejemplo en la Figura 3, estaba fuertemente aumentada en los ratones a los que se administró los conjugados con dPly 4-valentes en comparación con los ratones inmunizados con el PS solo. La misma mejoría se observó con las respuestas de IgG 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 grupos de 40 hembras de ratones Balb/c (de 4 semanas de edad) IM los días 0, 14, y 28 con 50 µl de PS solo 4-valente o PS conjugado con PhtD 4-valente, ambos mezclados con Adyuvante C.

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 ELISA de IgG anti-PS se midieron en los sueros recolectados el día 42.

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

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

Se inmunizaron grupos de 30 ratones C57Bl viejos (> 69 semanas de edad) IM los días 0, 14 y 28 con 50 µl de conjugados de PS 11-valentes o conjugados de PS 13-valentes, ambos mezclados con Adyuvante C (véase posteriormente).

La formulación vacunal 11-valente estaba compuesta por 0,1 µg de sacáridos 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 11-valente tratado bajo la Tabla 2). La formulación vacunal 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y el comentario de la vacuna 13-valente bajo la Tabla 2 [utilizando 22F conjugado directamente]). En el grupo 2 y 4 se detoxicó el vehículo pneumolisina con un tratamiento con GMBS, en el grupo 3 y 5 se hizo con formaldehído. En los grupos 2 y 3 se utilizó PhtD para conjugar el PS22F, 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 19A con toxoide diftérico y 22F con proteína D.



ES 2 630 759 T3

Los niveles de ELISA de IgG anti-PS19A y 22F se midieron en sueros individuales recolectados el día 42. La respuesta ELISA de IgG generada por los otros PS se midió en suero agrupado.

5 El 19A-dPly y 22F-PhtD administrado en la formulación vacunal conjugada de 13 valencias demostraron que eran inmunogénicos en ratones C57BI viejos (Tabla 15). La respuesta inmunitaria inducida contra otros PS no estaba impactada negativamente en ratones a los que se les administró la formulación 13-valente en comparación con los inmunizados con la formulación 11-valente.

**Tabla 15. Inmunogenicidad de PS en ratones C57BI viejos (niveles de IgG post-III)**

Ratones C57 Black viejos						
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  9A-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	media de agrupamiento	19,30	20,20	24,40	12,80	13,60
3	media de agrupamiento	6,32	4,84	5,21	6,74	2,54
4	media de agrupamiento	60,9	67,1	51,4	47,4	41,1
5	media de agrupamiento	1,34	3,81	3,06	2,75	1,23
6B	media de agrupamiento	4,41	4,12	5,88	1,58	5,64
7F	media de agrupamiento	0,83	0,81	1,65	1,98	0,99
9V	media de agrupamiento	13,8	23,7	20,0	13,1	9,6
14	media de agrupamiento	25,73	42,96	34,12	32,53	15,60
18C	media de agrupamiento	13,4	20,1	11,9	9,1	8,4
19F	media de agrupamiento	57,5	90,0	63,8	36,5	69,1
23F	media de agrupamiento	NR	NR	NR	NR	NR
19A	GMC	0,06	0,09	0,25	0,08	0,23
	IC	0,04-0,1	0,05-0,14	0,15-0,41	0,06-0,12	0,14-0,38
	%suero	33 %	47 %	83 %	53 %	73 %

	<b>GMC</b>	<b>NR</b>	<b>5,81</b>	<b>3,76</b>	<b>0,54</b>	<b>0,85</b>	<b>2,02</b>
<b>22F</b>	<b>IC</b>		3,2-10,6	1,8-7,9	0,3-1,1	0,4-1,7	1,2-3,4
	%suero	0 %	97 %	90 %	77 %	87 %	97 %

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

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

10 La formulación vacunal 11-valente 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 11-valente que se trata bajo la Tabla 2). La formulación vacunal 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y comentario de la vacuna 13-valente tratada abajo en la Tabla 2 [utilizando 22F conjugado directamente]). En el grupo 2 y 4 se detoxicó el vehículo pneumolisina con un tratamiento con GMBS, en el grupo 3 y 5 se hizo con formaldehído. En los grupos 2 y 3 se utilizó PhtD para conjugar el PS 22F, En los Grupos 4 y 5 se utilizó una fusión PhtD\_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6 se conjugó el 15 19A con toxoide diftérico y el 22F a la proteína D.

Los niveles de ELISA de IgG anti-PS19A se midieron en sueros individuales recolectados el día 42. La respuesta ELISA IgG generada contra los otros PS se midieron en sueros agrupados.

20 Los 19A-dPly y 22F-PhtD administrados en la formulación vacunal conjugada 13-valente demostraron ser inmunogénicos en ratones Balb/c jóvenes (Tabla 16). La respuesta inmunitaria inducida contra los otros PS no estaba impactada negativamente en ratones a los que se administró la formulación 13-valente en comparación con los inmunizados con la formulación 11-valente.

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

Ratones Balb/c							
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	media de agrupamiento	131,70	101,20	83,00	82,40	67,90	85,50
3	media de agrupamiento	21,85	10,38	12,53	8,83	8,73	14,98
4	media de agrupamiento	147,4	127,0	104,4	95,0	113,6	114,2
5	media de agrupamiento	21,38	20,29	18,26	18,95	18,02	23,04
6B	media de agrupamiento	1,97	4,76	3,72	2,35	1,43	1,05
7F	media de agrupamiento	7,69	4,58	4,77	4,24	3,92	3,94

<b>9V</b>	<b>media de agrupamiento</b>	<b>30,1</b>	<b>30,7</b>	<b>26,5</b>	<b>21,4</b>	<b>23,4</b>	<b>28,3</b>
<b>14</b>	<b>media de agrupamiento</b>	<b>28,78</b>	<b>27,67</b>	<b>26,23</b>	<b>21,54</b>	<b>24,34</b>	<b>13,73</b>
<b>18C</b>	<b>media de agrupamiento</b>	<b>53,4</b>	<b>52,37</b>	<b>46,5</b>	<b>57,8</b>	<b>47,8</b>	<b>75,8</b>
<b>19F</b>	<b>media de agrupamiento</b>	<b>186,6</b>	<b>157,7</b>	<b>169,3</b>	<b>178,9</b>	<b>181,9</b>	<b>223,2</b>
<b>23F</b>	<b>media de agrupamiento</b>	<b>4,98</b>	<b>3,9</b>	<b>5,11</b>	<b>0,57</b>	<b>3,13</b>	<b>4,57</b>
<b>19A</b>	<b>GMC</b>	<b>0,4</b>	<b>32,8</b>	<b>25,1</b>	<b>21,6</b>	<b>18,9</b>	<b>23,5</b>
	<b>IC</b>	0,2-0,6	26,4-40,7	20,6-30,6	17,5-26,7	15,1-23,5	19,5-28,5
	<b>%suero</b>	93 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>22F</b>	<b>GMC</b>	<b>NR</b>	<b>3,99</b>	<b>3,76</b>	<b>6,27</b>	<b>8,70</b>	<b>18,76</b>
	<b>IC</b>		1,9-8,42	1,8-8	3,8-10,4	5,4-13,9	15,2-23,1
	<b>%suero</b>	0 %	93 %	100 %	100 %	100 %	100 %

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

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

10 La formulación vacunal 11-valente 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 11-valente que se trata abajo en la Tabla 2). La formulación vacunal 13-valente contenía además 0,1 µg de conjugados PS19A-dPly y PS22F-PhtD (véase la Tabla 1 y comentario que trata de la vacuna 13-valente abajo en la Tabla 2 [utilizando 22F conjugado directamente]). En el grupo 2 y 4 se detoxicó el vehículo pneumolisina con un tratamiento con GMBS, en el grupo 3 y 5 se hizo con formaldehído. En los grupos 2 y 3 se utilizó PhtD para conjugar el PS 22F, En los Grupos 4 y 5 se utilizó una fusión PhtD\_E (la construcción VP147 del documento WO 03/054007). En el grupo 6 se conjugó el 19A con toxoide diftérico y el 22F a la proteína D.

15 Los niveles de ELISA de IgG anti-PS19A se midieron en sueros individuales recolectados el día 42. La respuesta ELISA IgG generada contra los otros PS se midieron en sueros agrupados.

**Tabla 17. Inmunogenicidad en Cobayas jóvenes (niveles de IgG post-III)**

		<b>Cobayas</b>					
<b>ELISA</b>		<b>GRUPO 1</b>	<b>GRUPO 2</b>	<b>GRUPO 3</b>	<b>GRUPO 4</b>	<b>GRUPO 5</b>	<b>GRUPO 6</b>
		<b>11V</b>	<b>11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD</b>	<b>11V 19A-dPly formol 22F-PhtD</b>	<b>11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E</b>	<b>11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E</b>	<b>11V 19A-DT 22F-PD</b>
		0,1 µg/50 µl Ady C	0,1 µg/50 µl Ady C	0,1 µg/50 µl Ady C	0,1 µg/50 µl Ady C	0,1 µg/50 µl Ady C	0,1 µg/50 µl Ady C
<b>1</b>	<b>media de agrupamiento</b>	<b>78.00</b>	<b>77.21</b>	<b>76.15</b>	<b>68.77</b>	<b>68.59</b>	<b>81.04</b>

3	media de agrupamiento	7.75	9.31	12.73	7.94	4.75	9.59
4	media de agrupamiento	130.7	94.4	132.6	166.8	85.0	101.3
5	media de agrupamiento	109.10	117.10	110.70	158.40	74.10	100.40
6B	media de agrupamiento	3.14	4.26	14.4	7.63	6.3	7.52
7F	media de agrupamiento	154.2	216.0	240.0	181.0	142.0	179.1
9V	media de agrupamiento	90.69	105.45	98.20	93.45	54.12	73.05
14	media de agrupamiento	71.19	77.18	46.53	59.67	38.47	53.69
18C	media de agrupamiento	109.4	122.3	137.1	79.9	73.7	83.1
19F	media de agrupamiento	73.9	102.5	112.2	75.5	62.3	72.1
23F	media de agrupamiento	19.19	30.74	29.44	31.52	19.13	24.94
19A	GMC	0.4	25.58	41.49	14.25	27.49	6.74
	IC	0.24-0.68	12-54.5	24.4-70.5	5.9-34.6	16.6-45.4	4-11.3
	%suero	75 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
22F	GMC	0.12	2.51	3.67	45.74	30.68	96.38
	IC	0.09-0.16	0.94-6.73	1.59-8.42	29.3-71.4	17-53.3	73.5-126.4
	%suero	10 %	95 %	95 %	100 %	100 %	100 %

**Ejemplo 11: Formulaciones que se van a hacer y ensayar**

Se hicieron las siguientes formulaciones (utilizando la vacuna 13-valente de la Tabla 1 y el serotipo 3 de la Tabla 5 – véase el comentario que se trata de la vacuna 14-valente abajo en la Tabla 2 [utilizando 22F directamente conjugado o por medio de un engarce ADH]). Los sacáridos se formularon con fosfato de aluminio y 3D-MPL como se muestra posteriormente.

5

<b>14V 25 µg MPL</b>						<b>14V 10 µg MPL</b>					
<b>Suma de BAC contenido en aluminio → FF</b>						<b>Suma de BAC contenido en aluminio → FF</b>					
<b>Por Dosis:</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

ES 2 630 759 T3

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
BAC MPL 50/200			25	4	100	BAC MPL 50/200			10	4	40
FF contenido en aluminio				Suma =	355	FF contenido en aluminio				Suma =	295

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

- En la tabla a continuación se muestra la concentración de la emulsión de componentes por 500 µl.

	Adyuvante A1	Adyuvante A2	Adyuvante A3
Ingredientes	Emulsión 250 µl ac/ag	Emulsión 125 µl ac/ag	Emulsión 50 µl 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	Emulsión 250 µl ac/ag	Emulsión 250 µl ac/ag	Emulsión 125 µl ac/ag	Emulsión 50 µl 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 se formularon con dos adyuvantes basados en liposomas:

**Composición de Adyuvante B1**

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

Liposomas:

- DOPC 1 mg
- colesterol 0,25 mg
- 3D-MPL 50 µg

10

QS21 50 µg

- 5 Tampón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,124 mg  
 Tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,290 mg  
 NaCl 2,922 mg  
 (100 mM)  
 Disolvente WFI q.s. hasta 0,5 ml  
 pH 6,1  
 1. Concentración Total  $\text{PO}_4 = 50 \text{ mM}$

**Composición de Adyuvante B2**

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

- 10 Liposomas:
- DOPC 1 mg
  - colesterol 0,125 mg
  - 3D-MPL 25  $\mu\text{g}$
  - QS21 25  $\mu\text{g}$
- 15 Tampón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,124 mg  
 Tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,290 mg  
 NaCl 2,922 mg  
 (100 mM)  
 Disolvente WFI q.s. hasta 0,5 ml  
 pH 6,1
- 20

d) Los sacáridos también se formularon con Adyuvante C (véase anteriormente para otras composiciones que se han utilizado con este adyuvante):

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

Emulsión de aceite en agua: 50  $\mu\text{l}$

- 25 - escualeno 2,136 mg  
 -  $\alpha$ -tocoferol 2,372 mg  
 - Tween 80 0,97 mg  
 - Colesterol 0,1 mg
- 30 3D-MPL 50  $\mu\text{g}$   
 QS21 50  $\mu\text{g}$   
 Tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,470 mg  
 Tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,219 mg  
 NaCl 4,003 mg  
 (137 mM)
- 35 KCl 0,101 mg  
 (2,7 mM)  
 Disolvente WFI q.s. ad 0,5 ml  
 pH 6,8

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

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

45 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 a PD.

50 Se compararon dos formulaciones, constituidas de 22F-PhtD preparada 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 la vacuna 13-valente hecha o con 22F conjugado directamente o por medio de un espaciador ADH. Las formulaciones vacunales se suplementaron con adyuvante C.

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

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

**Ejemplo 13. Impacto de los nuevos adyuvantes sobre la inmunogenicidad de conjugados de PS**

**capsular de *Streptococcus pneumoniae***

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

- 5 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, Tabla 1 y el comentario bajo la Tabla 2 para las características de la vacuna 13-valente hecha con 22F conjugado directamente.

Se compararon cuatro formulaciones, suplementadas con AIPO4, adyuvante A1, adyuvante A4 o adyuvante A5.

- 10 Los niveles de ELISA IgG anti-PS, Ply, PhtD y PD se midieron en los sueros recolectados el día 42 y agrupados por grupo.

La siguiente relación se calculó para cada antígeno: Nivel de IgG inducido con el nuevo adyuvante ensayado / nivel de IgG inducido con AIPO4.

- 15 Todos los nuevos adyuvantes ensayados mejoraban al menos en 2 veces las respuestas inmunitarias a los conjugados 13-valentes en comparación con la formulación AIPO4 clásica (Figura 7).

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

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

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 comentario bajo la Tabla 2 para las características de la vacuna 11-valente. Todas las formulaciones se suplementaron con adyuvante C.

- 25 Se inocularon neumococos Tipo 19F ( $5.10^8$  ufc) en el pulmón derecho el día 42. Las colonias se contaron en lavados broncoalveolares recolectados los días 1, 3 y 7 post-desafío. Los resultados se expresaron como el número de animales por grupo muertos, con el pulmón colonizado o libre el día 7 tras el desafío.

- 30 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 11-valentes y la combinación PhtD + dPly ( $p < 0,12$ , ensayo exacto de Fisher) en comparación con el grupo del adyuvante solo.

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

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

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

- 40 Los ratones se desafiaron por vía intranasal con  $5.10^6$  ufc de neumococos tipo 4 el día 28 (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 8 post-desafío.

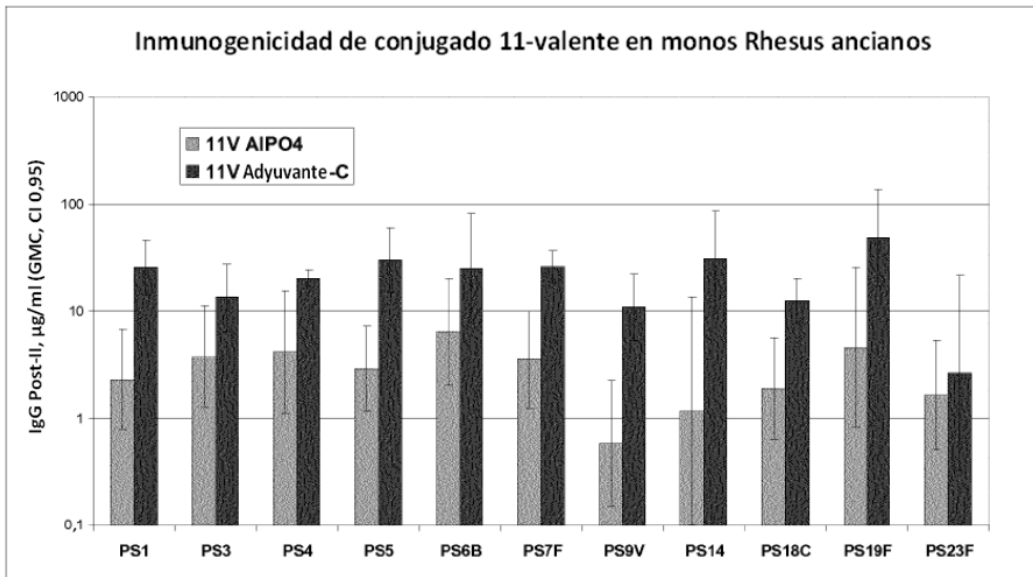
El 22F-AHPhtD inducía una respuesta de IgG anti-PhtD significativamente mayor y una mejor protección contra el desafío tipo 4 que el 22F-PhtD.

## REIVINDICACIONES

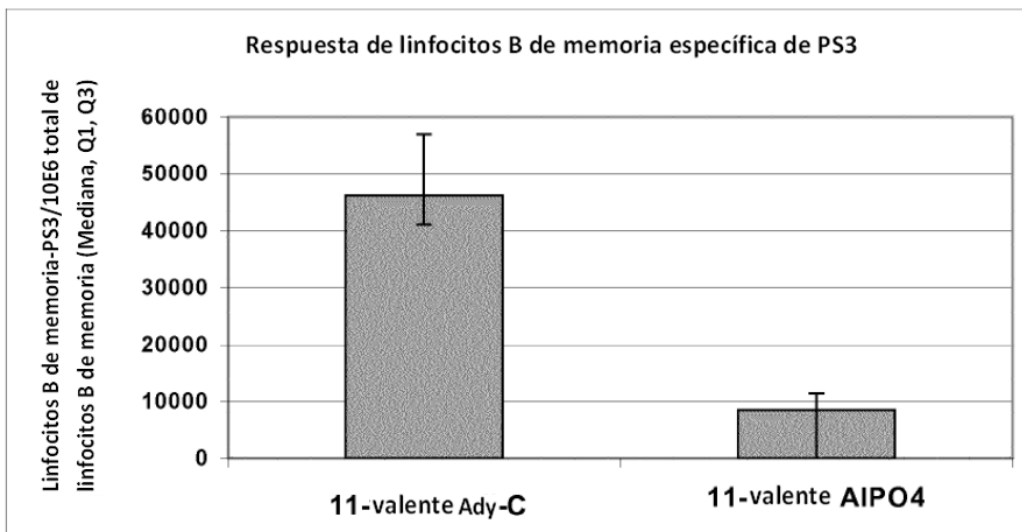
- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende conjugados de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* de los serotipos 19A y 19F en la que 19A se conjuga con un primer toxoide bacteriano y 19F se conjuga con un segundo toxoide bacteriano que es toxoide diftérico o CRM197 y que comprende adicionalmente conjugados de los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C y 23F, en la que el primer toxoide bacteriano es una proteína diferente del segundo toxoide bacteriano.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 en la que el primer toxoide bacteriano se selecciona de entre toxoide tetánico, pneumolisina, toxoide diftérico o CRM197.
- 10 3. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-2 que comprende adicionalmente un conjugado del sacárido capsular 3 de *S. pneumoniae*.
4. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-3 que comprende además un conjugado del sacárido capsular 6A de *S. pneumoniae*.
5. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además una o más proteínas de *S. pneumoniae* conjugadas o no conjugadas.
- 15 6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5 en la que dichas una o más proteínas de *S. pneumoniae* se seleccionan de entre la familia de Tríadas de Poli Histidina (PhtX), familia de proteínas de unión a la colina (CbpX), CbpX truncadas, familia LytX, LytX truncadas, proteínas quiméricas CbpX truncada-LytX truncada, pneumolisina detoxicada (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133.
- 20 7. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 que comprende una proteína PhtX.
8. La composición inmunogénica de la reivindicación 6 en la que la proteína PhtX es PhtD.
9. La composición inmunogénica de la reivindicación 8 que 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.
- 25 10. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además un adyuvante.
11. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 12. Un procedimiento de fabricación de una vacuna de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende la etapa de mezclar la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. El uso de la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1 a 10 o la vacuna de la reivindicación 11 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades producidas por la infección por *Streptococcus pneumoniae*.
- 35 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13 en el que la enfermedad es cualquiera o ambas de entre neumonía o enfermedad neumocócica invasiva (IPD) de seres humanos ancianos, exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) 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.

40

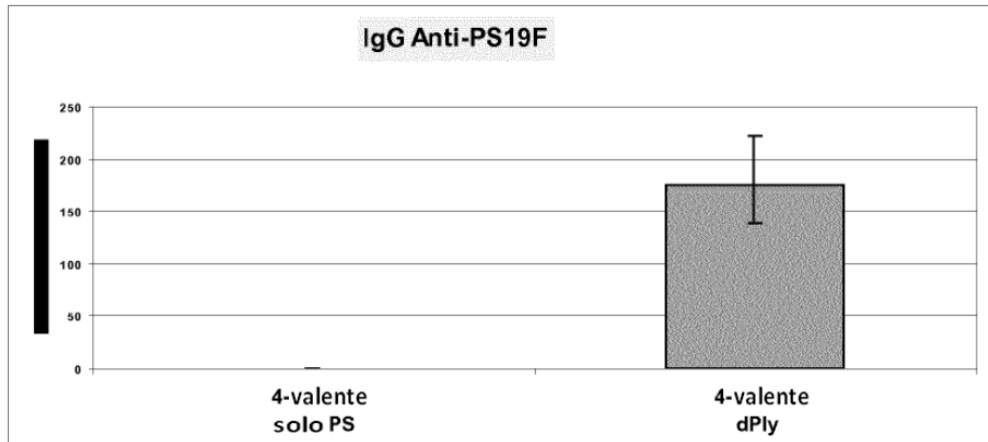




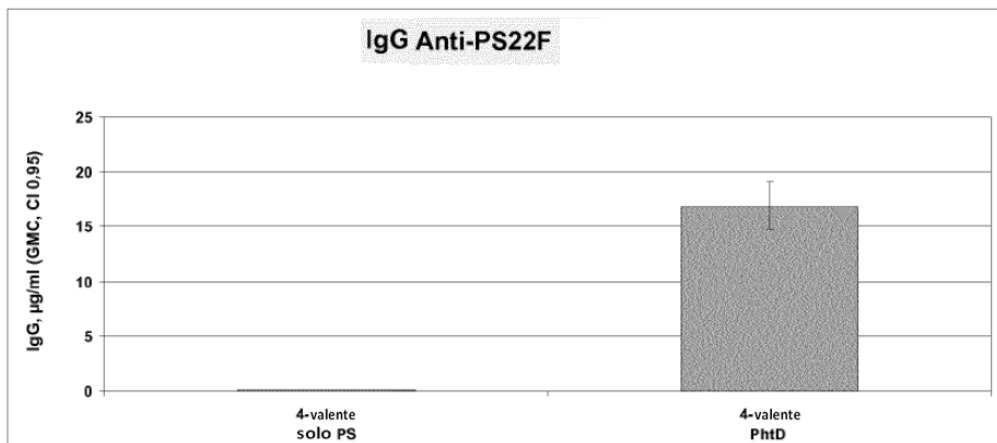
**Figura 1, Inmunogenicidad del conjugado en monos Rhesus (niveles de IgG anti-PS post-II)**



**Figura 2, Inmunogenicidad del conjugado en monos Rhesus (frecuencias de linfocitos B de memoria anti-PS3 post-II)**



**Figura 3, Inmunogenicidad de PS19F en ratones Balb/c (niveles de IgG post-III)**



**Figura 4, Inmunogenicidad de PS22F en ratones Balb/c (niveles de IgG post-III)**

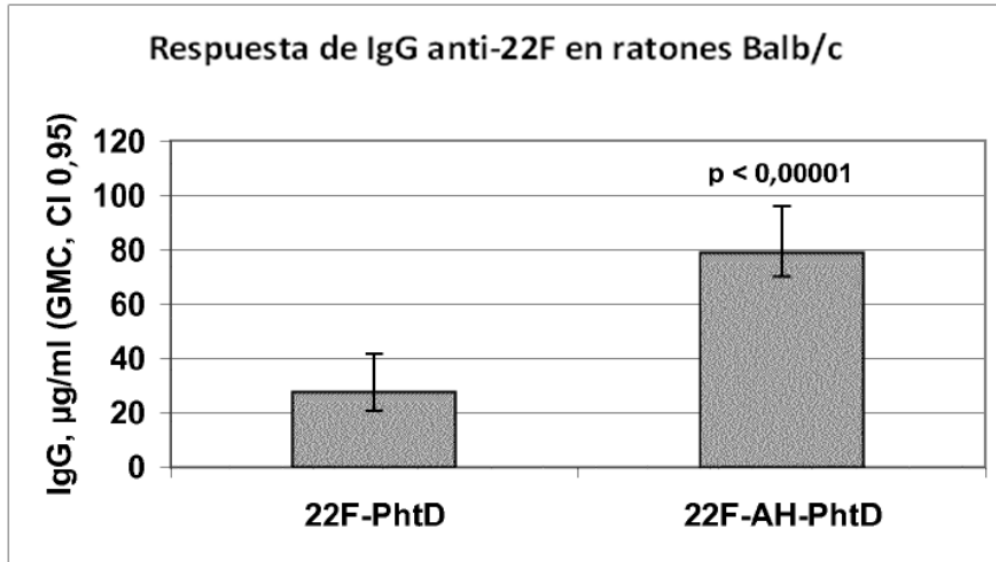


Figura 5, Niveles en el suero de anticuerpos IgG anti-PS

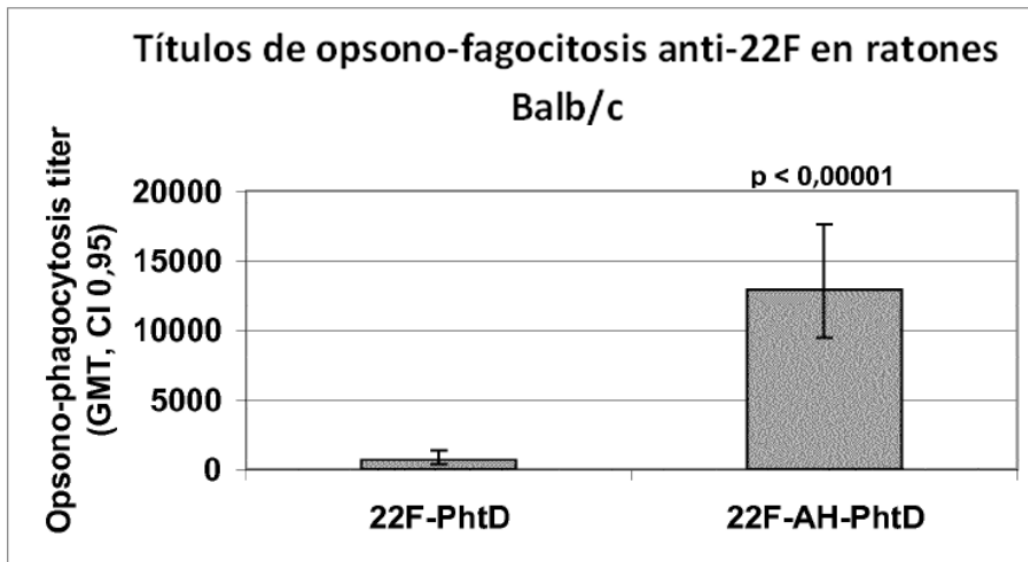


Figura 6, títulos de opsono-fagocitosis

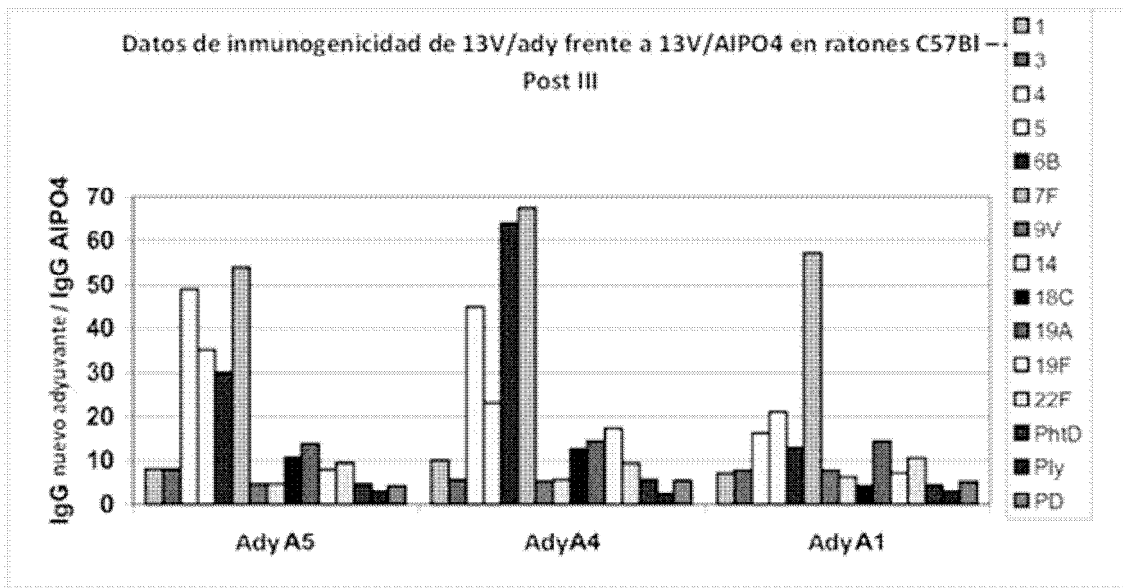


Figura 7, comparación de respuestas de IgG inducidas por los nuevos adyuvantes con la respuesta producida con AIPO<sub>4</sub>

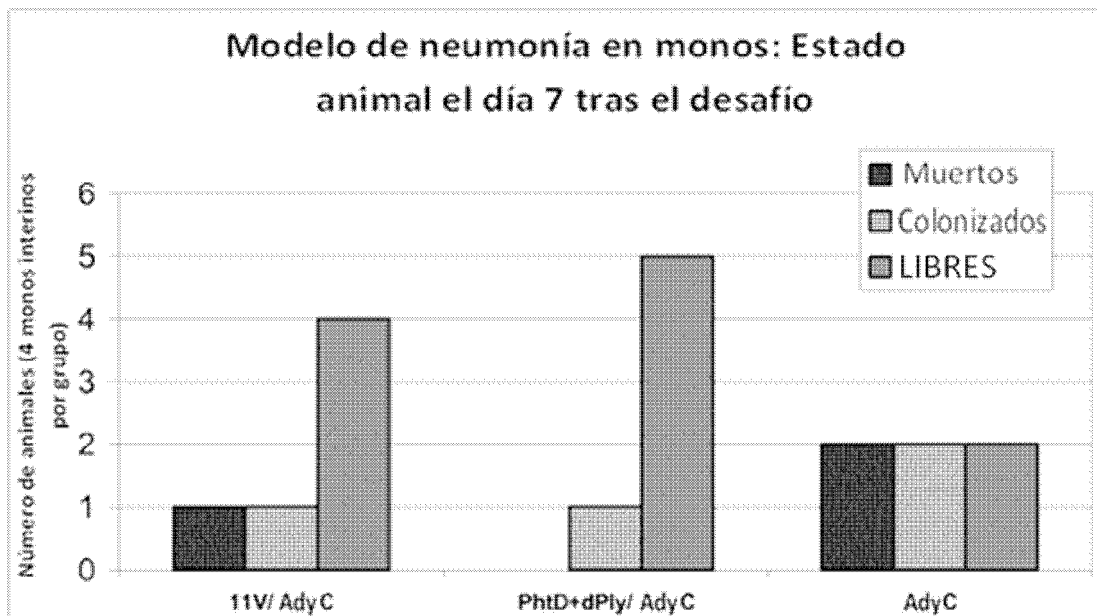


Figura 8, eficacia protectora de la combinación de proteínas PthD + dPly contra la colonización pulmonar del tipo 19F en monos Rhesus

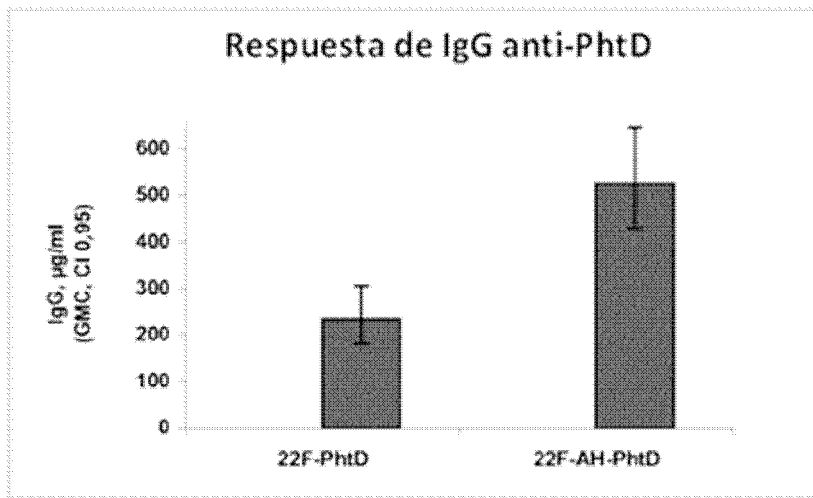


Figura 9 Respuesta de IgG anti-PhtD en el suero

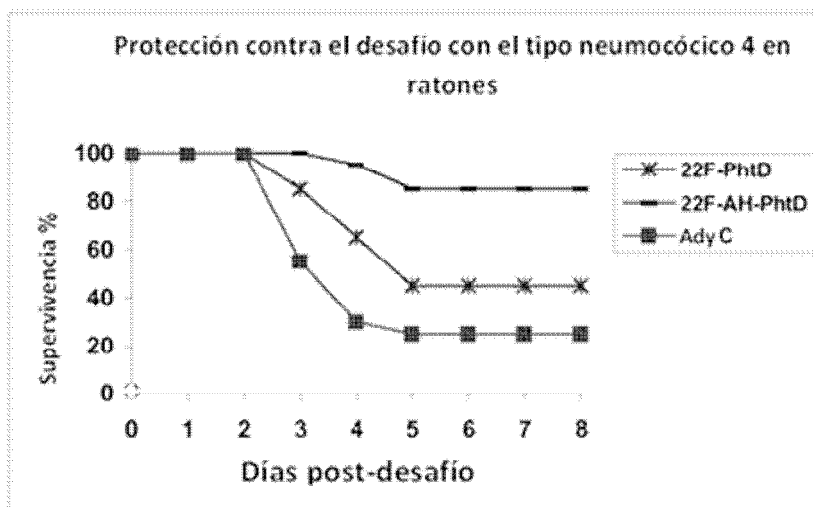


Figura 10  
Protección contra el desafío neumocócico tipo 4 en ratones