(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 681 698**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/13 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 33/06 (2006.01)
A61K 33/08 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61K 31/66 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 33/42 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2012** **PCT/IB2012/050989**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012** **WO12117377**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012** **E 12709382 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 2680885**

(54) Título: **Vacunas de combinación con menores dosis de antígeno y/o adyuvante**

(30) Prioridad:

02.03.2011 US 201161448226 P
01.12.2011 US 201161565980 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.09.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

O'HAGAN, DEREK;
BAUDNER, BARBARA;
SKIBINSKI, DAVID A.G. y
SINGH, MANMOHAN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 681 698 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

Vacunas de combinación con menores dosis de antígeno y/o adyuvante

Campo técnico

Esta invención está en el campo de las vacunas de combinación, es decir, vacunas que contienen inmunógenos mixtos de más de un patógeno, de modo que la administración de la vacuna puede inmunizar simultáneamente a un sujeto contra más de un patógeno.

Antecedentes de la técnica

Las vacunas que contienen antígenos de más de un organismo patógeno dentro de una dosis individual se conocen como vacunas “multivalentes” o de “combinación”. Se han aprobado diferentes vacunas de combinación para uso humano en la UE y en EE.UU., que incluyen vacunas trivalentes para proteger contra la difteria, tétanos y tos ferina (vacunas “DTP”) y vacunas trivalentes para proteger contra el sarampión, paperas y rubeola (vacunas “SPR”). Las vacunas de combinación ofrecen a los pacientes la ventaja de recibir un número reducido de inyecciones, que puede conducir a la ventaja clínica de mayor observancia (p. ej., véase el capítulo 29 de la referencia 1), en particular para la vacunación pediátrica.

Las vacunas de combinación actuales pueden incluir cantidades relativamente altas de sales de aluminio como adyuvantes que preocupan a algunos grupos de presión de pacientes a pesar de los estudios de seguridad empíricos [2,3]. Por ejemplo, los niveles de aluminio en las vacunas de combinación conocidas son los siguientes (véase también la tabla a más adelante):

Nombre comercial	Antígenos	Contenido de Al^{+++} por dosis unitaria
Pediacel	D-T-Pa-Hib-PVI	0,33 mg
Pediarix	D-T-Pa-VHB-PVI	≤0,85 mg
Pentacel	D-T-Pa-Hib-PVI	0,33 mg
Tritanrix-HepB	D-T-Pe-HBV	0,63 mg
Quinvaxem	D-T-Pe-Hib-VHB	0,3 mg
Hexavac	D-T-Pa-PVI-Hib-VHB	0,3 mg
Boostrix (EE.UU.)	D-T-Pa	≤0,39 mg

Una vacuna con niveles inferiores de aluminio sería de ayuda para algunos grupos de pacientes, y es un objetivo de la presente invención proporcionar dichas vacunas, de forma ideal sin pérdida de potencia de la vacuna.

Otro inconveniente con las vacunas actuales es que requieren cantidades relativamente altas de antígeno, mientras que diferentes documentos muestran que se pueden lograr efectos protectores con menores cantidades de antígeno, p. ej., la referencia 4 muestra que la cantidad de antígeno de Hib se puede reducir a la mitad en la vacuna D-T-Pe-Hib sin pérdida de respuesta inmunológica, y la referencia 5 propone que se puede usar una dosis reducida de PVI a la vez que se mantiene un nivel adecuado de protección contra la polio. Un objeto de la presente invención es proporcionar vacunas adicionales con cantidades reducidas de antígeno, idealmente sin pérdida de efecto inmunoprotector.

Scheifele et al. (*Immunology & Infectious Diseases* (Oxford) 1995, 5(1): 73-77) consideraron si las reducciones en el contenido de toxoide diftérico o de aluminio podrían reducir la reactogenicidad de dosis de refuerzo de las vacunas DPT y concluyeron que la causa principal de reacciones locales después de la vacuna de refuerzo no eran el toxoide diftérico o el aluminio. El documento WO 2007/109813 describe compuestos de imidazoquinoxalina para usar como inmunomoduladores. El documento WO 2009/111337 describe moduladores de receptores tipo Toll (TLR), y métodos de uso de dichos compuestos.

Compendio de la invención

La invención proporciona una variedad de composiciones de vacunas de combinación. Las composiciones tienen una cantidad relativamente baja de aluminio, pero no obstante tienen inmunogenicidad que es comparable a las vacunas de combinación con una cantidad relativamente alta de aluminio.

Específicamente, la invención proporciona una composición inmunógena en una forma de dosis unitaria para la administración a un paciente que comprende (i) un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un antígeno de pertussis

acelular que contiene un toxoide pertussis, (ii) un adyuvante de sal de aluminio, en donde la cantidad de Al^{+++} en la dosis unitaria es de 10 µg a menos de 0,2 mg, y (iii) un agonista de TLR7 adsorbido al adyuvante de sal de aluminio, en donde el agonista de TLR7 incluye al menos un grupo fosfato o fosfonato, y en donde el adyuvante de sal de aluminio y el agonista de TLR7 forman un complejo adyuvante estable que retiene la capacidad del adyuvante de sal de aluminio para adsorber antígenos.

La invención también proporciona una composición inmunógena que comprende (i) un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis, y (ii) un adyuvante de sal de aluminio, en donde la concentración de Al^{+++} es de 20 µg/ml a menos de 0,4 mg/ml, y (iii) un agonista de TLR7 adsorbido al adyuvante de sal de aluminio, en donde el agonista de TLR7 incluye al menos un grupo fosfato o fosfonato y en donde el adyuvante de sal de aluminio y el agonista de TLR7 forman un complejo adyuvante estable que retiene la capacidad del adyuvante de sal de aluminio para adsorber antígenos.

En algunas realizaciones de la invención, las composiciones inmunógenas comprenden una dosis baja de cada uno de un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis.

El adyuvante de sal de aluminio está ventajosamente adsorbido en el agonista de TLR, como se ha descrito antes.

También se describe en la presente memoria un programa de inmunización para un bebé en el que solo se administran una o dos composiciones que contienen DTaP. Este aspecto se detalla adicionalmente más adelante.

Toxoide diftérico

La difteria es causada por *Corynebacterium diphtheriae*, una bacteria aerobia que no forma esporas Gram positiva. Este organismo expresa una exotoxina (toxina diftérica) que ribosila el ADP codificado por profago, que puede ser tratada (p. ej. usando formaldehído) para dar un toxoide que ya no es tóxico pero que sigue siendo antigénico y es capaz de estimular la producción de anticuerpos antitoxina específicos después de inyección. Se describen toxoides diftéricos con más detalle en el capítulo 13 de la referencia 1. Los toxoides diftéricos preferidos son los preparados por tratamiento con formaldehído. El toxoide diftérico se puede obtener por cultivo de *C. diphtheriae* en medio de crecimiento (p. ej. medio Fenton o medio Linggoud y Fenton), que se puede complementar con extracto de bovino, seguido de tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material toxoide después se puede tratar por un procedimiento que comprende la filtración y/o diálisis estéril.

Las cantidades del toxoide diftérico se pueden expresar en unidades internacionales (UI). Por ejemplo, el NIBSC [6] suministra el “tercer estándar internacional de toxoide diftérico adsorbido de 1999” [7,8], que contiene 160 UI por ampolla. Como una alternativa al sistema de UI, la unidad “Lf” ("unidades de floculación", la "dosis de floculación" o el “límite de floculación”) se define como la cantidad de toxoide que, cuando se mezcla con una unidad internacional de antitoxina, produce una mezcla que flocula de forma óptima [9]. Por ejemplo, el NIBSC suministra el “toxoide diftérico, sencillo" [10], que contiene 300 Lf por ampolla, y también suministra “el primer reactivo de referencia internacional para el toxoide diftérico para el ensayo de floculación” [11], que contiene 900 Lf por ampolla. La concentración de toxina diftérica en una composición se puede determinar fácilmente usando un ensayo de floculación por comparación con un material de referencia calibrado frente a dichos reactivos de referencia. La conversión entre los sistemas de UI y Lf depende de la preparación de toxoide particular.

En algunas realizaciones de la invención, una composición incluye una “dosis baja” de toxoide diftérico. Esto significa que la concentración del toxoide diftérico en la composición es ≤8 Lf/ml, p. ej. <7, <6, <5, <4, <3, <2, <1 Lf/ml, etc. Por lo tanto, en un volumen de dosis unitaria de 0,5 ml típico, la cantidad de toxoide diftérico es menor que 4 Lf p. ej. <3, <2, <1, <½ Lf, etc.

El toxoide diftérico en la composición preferible está adsorbido (más preferiblemente totalmente adsorbido) sobre el adyuvante de sal de aluminio, preferiblemente sobre un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Toxoide tetánico

El tétanos es causado por *Clostridium tetani,* un bacilo que forma esporas, Gram positivo. Este organismo expresa una endopeptidasa ("toxina tetánica"), que se puede tratar para dar un toxoide que ya no es tóxico, pero sigue siendo antigénico y es capaz de estimular la producción de anticuerpos antitoxina específicos después de inyección. Los toxoides tetánicos se describen con más detalle en el capítulo 27 de la referencia 1. Los toxoides tetánicos preferidos son los preparados por tratamiento con formaldehído. El toxoide tetánico se puede obtener por cultivo de *C. tetani* en medio de crecimiento (p. ej., un medio Latham derivado de caseína bovina), seguido de tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. Después el material se puede tratar por un procedimiento que comprende filtración y/o diálisis estéril.

Las cantidades de toxoides tetánicos se pueden expresar en unidades internacionales (UI). Por ejemplo, el NIBSC suministra el “Tercer estándar internacional de toxoide tetánico adsorbido de 2000” [12,13], que contiene 469 UI por ampolla. Como con el toxoide diftérico, la unidad "Lf" es una alternativa al sistema de UI. El NIBSC suministra el “Primer reactivo de referencia internacional para el toxoide tetánico para el ensayo de floculación” [14], que contiene 1000 Lf por ampolla. La concentración de toxina de la difteria en una composición se puede determinar fácilmente

usando un ensayo de floculación por comparación con un material de referencia calibrado frente a dichos reactivos de referencia.

En algunas realizaciones de la invención, una composición incluye una “dosis baja” de toxoide tetánico. Esto significa que la concentración del toxoide tetánico en la composición es ≤3,5 Lf/ml, p. ej. <3, <2,5, <2, <1, <1/2 Lf/ml, etc. Por lo tanto, en un volumen de dosis unitaria de 0,5 ml típico, la cantidad de toxoide tetánico es menor que 1,75 Lf p. ej. <1,5, <1, <1/2, <1/4 Lf, etc.

El toxoide tetánico en la composición preferible está adsorbido (a veces totalmente adsorbido) sobre el adyuvante de sal de aluminio, preferiblemente sobre un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Toxoide pertussis

Bordetella pertussis produce tos convulsiva. Los antígenos de pertussis en vacunas son celulares (célula entera, en forma de células *B. pertussis* inactivadas; "Pe") o acelulares ("Pa"). La preparación de antígenos de pertussis celulares está bien documentada (p. ej., véase el capítulo 21 de la referencia 1), p. ej., se puede obtener por inactivación del cultivo en fase I de *B. pertussis.* Cuando se usan solo antígenos acelulares, se incluyen uno, dos o (preferiblemente) tres de los siguientes antígenos: (1) toxina pertussis detoxificada (toxoide pertussis, o "TP"); (2) hemaglutinina filamentosa ("HAF"); (3) pertactina (también conocida como la proteína de membrana exterior de 69 kilodaltons"). Estos tres antígenos se pueden preparar para aislamiento del cultivo de *B. pertussis* cultivado en medio líquido de Stainer-Scholte modificado. El TP y HAF se pueden aislar del caldo de fermentación (p. ej., por absorción sobre gel de hidroxiapatito), mientras que la pertactina se puede extraer de las células por tratamiento térmico y floculación (p. ej., usando cloruro de bario). Los antígenos se pueden purificar en etapas sucesivas de cromatografía y/o precipitación. El TP y HAF se pueden purificar por cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión por tamaños. La pertactina se puede purificar por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba y cromatografía por exclusión de tamaños, o por IMAC. La HAF y la pertactina se pueden tratar con formaldehído antes de usar de acuerdo con la invención. Preferiblemente el TP se detoxifica por tratamiento con formaldehído y/o glutaraldehído. Como una alternativa a este procedimiento de detoxificación química, el TP puede ser un TP mutante en el que la actividad enzimática se ha reducido por mutagénesis [1] (p. ej., el mutante doble 9K/129G [2]), pero se prefiere la detoxificación por tratamiento químico.

La invención puede usar un antígeno de Pe que contiene TP, un antígeno de Pa que contiene TP. Cuando se usa un antígeno de Pa, una composición de la invención típicamente incluirá, además del TP, HAF y, opcionalmente incluye pertactina. También puede incluir opcionalmente fimbrias de tipo 2 y 3.

Las cantidades de antígenos de pertussis acelulares típicamente se expresan en microgramos. En algunas realizaciones de la invención, una composición incluye una "dosis baja" de toxoide pertussis. Esto significa que la concentración de toxoide pertussis en la composición es ≤5 µg/ml, p. ej., <4, <3, <2,5, <2, <1 µg/ml, etc. Por lo tanto, en un volumen de dosis unitaria de 0,5 ml típico, la cantidad de toxoide pertussis es menor de 2,5 µg, p. ej. <2, <1,5, <1, <0,5 µg, etc.

El toxoide pertussis en la composición preferiblemente está adsorbido (a veces totalmente adsorbido) sobre el adyuvante de sal de aluminio, preferiblemente sobre un adyuvante de hidróxido de aluminio. Cualquier HAF también puede estar adsorbido en un adyuvante de hidróxido de aluminio. Cualquier pertactina puede estar adsorbido en un adyuvante de fosfato de aluminio.

Conjugados de Hib

Haemophilus influenzae tipo b ("Hib") produce meningitis bacteriana. Las vacunas de Hib se basan típicamente en antígeno sacárido capsular (p. ej., capítulo 14 de la ref. 1), cuya preparación está bien documentada (p. ej. referencias 17 a 26). El sacárido de Hib está conjugado con una proteína transportadora con el fin de potenciar su inmunogenicidad, en especial en niños. Las proteínas transportadoras típicas son el toxoide tetánico, toxoide diftérico, el derivado CRM197 del toxoide diftérico, proteína D de *H. influenzae* y un complejo de proteínas de membrana exterior de un meningococo del serogrupo B. El toxoide tetánico es un transportador preferido, como se usa en el producto normalmente denominado "PRP-T". El PRP-T se puede hacer activando un polisacárido capsular de Hib usando bromuro de cianógeno, acoplando el sacárido activado a un conector de ácido adípico (tal como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), típicamente la sal de hidrocloruro), y después haciendo reaccionar la entidad de conector-sacárido con una proteína transportadora de toxoide tetánico. El resto de sacárido del conjugado puede comprender fosfato de poliribosilribitol (PRP) de longitud entera preparado a partir de bacterias Hib y/o fragmentos de PRP de longitud entera. Se pueden usar conjugados con una relación de sacárido:proteína (p/p) entre 1:5 (es decir, proteína en exceso) y 5:1 (es decir, sacárido en exceso), p. ej., relaciones entre 1:2 y 5:1 y relaciones entre 1:1,25 y 1:2,5. Sin embargo, en vacunas preferidas, la relación en peso de sacárido a proteína transportadora es entre 1:2,5 y 1:3,5. En vacunas donde el toxoide tetánico está presente tanto como un antígeno y como una proteína transportadora, entonces la relación en peso del sacárido a la proteína transportadora en el conjugado puede ser entre 1:0,3 y 1:2 [27]. La administración de conjugado de Hib preferiblemente da como resultado una concentración de anticuerpo anti-PRP ≥0,15 µg/ml, y más

preferiblemente ≥1 µg/ml, y estos son los umbrales de respuesta de referencia

Las cantidades de antígenos de Hib se expresan típicamente en microgramos. Para los antígenos conjugados esta cifra se basa en el contenido de sacárido del conjugado. En algunas realizaciones de la invención una composición incluye una "dosis baja" de un conjugado de Hib. Esto significa que la concentración de sacárido de Hib en la composición es ≤5 µg/ml, p. ej., <4, <3, <2,5, <2, <1, etc. Por lo tanto, en un volumen de dosis unitaria de 0,5 ml típico, la cantidad de Hib es menor que 2,5 µg, p. ej. <2, <1,5, <1, <0,5, etc.

El conjugado de Hib puede estar adsorbido sobre el adyuvante de sal de aluminio o puede no estar adsorbido.

Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

El virus de la hepatitis B (VHB) es uno de los agentes conocidos que causa hepatitis vírica. El virión del VHB consiste en un número interior rodeado de una cubierta o cápside de proteína exterior, y el núcleo vírico contiene el genoma de ADN vírico. El componente principal de la cápside es una proteína conocida como antígeno de superficie del VHB o, más habitualmente, "HBsAg", que típicamente es un polipéptido de 226 aminoácidos con un peso molecular de ~24 kDa. Todas las vacunas para la hepatitis B existentes contienen HBsAg, y cuando este antígeno se administra a un vacunado normal, estimula la producción de anticuerpos anti-HBsAg que protegen contra la infección por el VHB.

Para la fabricación de la vacuna, el HBsAg se puede hacer de dos formas. El primer método implica la purificación del antígeno en forma de partículas del plasma de portadores de hepatitis B crónicos, puesto que se sintetizan grandes cantidades de HBsAg en el hígado y son liberadas al torrente sanguíneo durante una infección por el VHB. El segundo modo implica la expresión de proteína por métodos de ADN recombinantes. El HBsAg para usar con el método de la invención es expresado de forma recombinante en células de levaduras. Las levaduras adecuadas incluyen los hospedantes *Saccharomyces* (tales como *S. cerevisiae*) o *Hanensula* (tal como *H. polymorpha*).

A diferencia del HBsAg natural (es decir, como el producto purificado del plasma), el HBsAg expresado por levaduras en general no está glucosilado, y esta es la forma más preferida del HBsAg para usar con la invención. El HBsAg expresado por levaduras es muy inmunógeno y se puede preparar sin el riesgo de contaminación del producto sanguíneo.

El HBsAg en general estará en forma de partículas sustancialmente esféricas (diámetro medio de aproximadamente 20 nm), que incluye una matriz lipídica que comprende fosfolípidos. Las partículas de HBsAg expresadas por levaduras pueden incluir fosfatidilinositol, que no se encuentra en viriones del VHB naturales. Las partículas también pueden incluir una cantidad no tóxica de LPS con el fin de estimular el sistema inmunitario [28]. Las partículas pueden retener tensioactivos no iónicos (p.ej., polisorbato 20) si este se usa durante la rotura de la levadura [29].

Un método preferido para la purificación del HBsAg implica, después de la rotura celular: ultrafiltración; cromatografía por exclusión de tamaños; cromatografía de intercambio aniónico; ultracentrifugación; desalación; y filtración estéril. Los lisados se pueden precipitar después de la rotura celular (p. ej., usando un polietilenglicol), dejando el HBsAg en solución, listo para ultrafiltración.

Después de purificación, el HBsAg se puede someter a diálisis (p. ej., con cisteína), que se pueden usar para cualquier conservante con mercurio tal como timerosal que se pueda haber usado durante la preparación del HBsAg [30]. Se prefiere la preparación exenta de timerosal.

Preferiblemente el HBsAg es de VHB de subtipo adw2.

Las cantidades de HBsAg se expresan típicamente en microgramos. En algunas realizaciones de la invención, una composición incluye una "dosis baja" de HBsAg. Esto significa que la concentración de HBsAg en la composición es ≤5 µg/ml p. ej. <4, <3, <2,5, <2, <1, etc. Por lo tanto, en un volumen de dosis unitaria de 0,5 ml típico, la cantidad de HBsAg es menor que 2,5 µg p. ej. <2, <1,5, <1, <0,5, etc.

El HBsAg se puede adsorber sobre el adyuvante de sal de aluminio (preferiblemente adsorbido sobre un adyuvante de fosfato de aluminio).

Antígeno de poliovirus inactivado (PVI)

La poliomelitis puede ser causada por uno de los tres tipos de poliovirus. Los tres tipos son similares y causan síntomas idénticos, pero son antigénicamente muy diferentes y la infección por un tipo no protege contra la infección por otros. Como se explica en el capítulo 24 de la referencia 1, se prefiere, por lo tanto, usar tres antígenos de poliovirus con la invención, poliovirus de tipo 1 (p. ej., cepa Mahoney), poliovirus tipo 2 (p. ej., cepa MEF-1), y poliovirus tipo 3 (p. ej., cepa Saukett). Como una alternativa a estas cepas, se pueden usar cepas de Sabin de tipos 1 a 3, por ejemplo, como se describe en las referencias 31 y 32.

Los poliovirus se pueden cultivar en cultivo celular. Un cultivo preferido usa una línea de células Vero, que es una línea celular continua derivada de riñón de mono. Las células Vero pueden ser de forma conveniente microtransportadores cultivados. El cultivo de las células Vero antes y durante la infección vírica puede implicar el

uso de material obtenido de bovino, tal como suero de ternera, y de hidrolizado de lactoalbúmina (p. ej., obtenido por degradación enzimática de lactoalbúmina). Dicho material obtenido de bovino debería obtenerse de fuentes exentas de EEB u otras EET.

Después del crecimiento, los viriones se pueden purificar usando técnicas tales como ultrafiltración, diafiltración y cromatografía. Antes de la administración a pacientes, los poliovirus se deben inactivar, y esto se puede lograr por tratamiento con formaldehído antes de que los virus se usen en el procedimiento de la invención.

Los virus se cultivan, purifican e inactivan preferiblemente individualmente, y después se combinan para dar una mezcla en masa para uso con la invención.

Las cantidades de poliovirus inactivado (PVI) se expresan típicamente en la unidad "UD" (la "unidad de antígeno D" [33]). En algunas realizaciones de la invención, una composición incluye una "dosis baja" de un poliovirus. Para un poliovirus tipo 1, esto significa que la concentración del virus en la composición es ≤ 20 UD/ml, p. ej. <18, <16, <14, <12, <10, etc. Para un poliovirus tipo 2, esto significa que la concentración del virus en la composición es ≤4 UD/ml, p. ej. <3, <2, <1, <0,5, etc. Para un poliovirus tipo 3, esto significa que la concentración del virus en la composición es ≤ 16 UD/ml, por ej. <14, <12, <10, <8, <6, etc. Cuando están presentes los tres poliovirus de tipos 1, 2 y 3, los tres antígenos pueden estar presentes en una relación de UD de 5:1:4 respectivamente, o en cualquier otra relación adecuada, por ejemplo, una relación de 15:32:45 cuando se usan cepas Sabin [31]. Una dosis baja de antígeno de las cepas de Sabin es particularmente útil, con ≤10 UD de tipo 1, ≤20 UD de tipo 2 y ≤30 UD de tipo 3 (por dosis unitaria).

Los poliovirus preferiblemente no son adsorbidos a ningún adyuvante antes de ser formulados, pero después de formulación pueden quedar adsorbidos sobre cualquier adyuvante(s) de aluminio en la composición.

Antígenos adicionales

Además de incluir antígenos D, T, Pa, HBsAg, Hib y/o poliovirus, las composiciones inmunógenas de la invención pueden incluir antígenos de otros patógenos. Por ejemplo, estos antígenos pueden ser de *N. meningitidis* (uno o más de los serogrupos A, B, C, W135 y/o Y) o *S. pneumoniae*.

Sacáridos meningocócicos

Cuando una composición incluye un conjugado de sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* puede haber uno o más de dichos conjugados. Es típica la inclusión de 2, 3 o 4 de los serogrupos A, C, W135 e Y, p. ej., A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, A+W135+Y, A+C+W135+Y, etc. Son útiles los componentes que incluyen sacáridos de los cuatro serogrupos A, C, W135 e Y, como en los productos MENACTRA™ y MENVEO™. Cuando se incluyen conjugados de más de un serogrupo, entonces pueden estar presentes en masas sustancialmente iguales, p. ej., la masa de sacárido de cada serogrupo está dentro de ± 10% uno de otro. Una cantidad típica por serogrupo es entre 1 µg y 20 µg, p. ej., entre 2 y 10 µg por serogrupo, o aproximadamente 4 µg o aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg. Como una alternativa a una proporción sustancialmente igual, se puede usar una masa doble de sacárido del serogrupo A.

La administración de un conjugado preferiblemente da como resultado un aumento en el título del ensayo bactericida del suero (SBA) para el serogrupo relevante de al menos 4 veces, y preferiblemente al menos 8 veces. Los títulos de SBA se pueden medir usando complemento de conejo recién nacido o complemento humano [34].

El sacárido capsular del serogrupo A de meningococo es un homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato con unión (α1→6), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. La acetilación en la posición C-3 puede ser del 70-95%. Las condiciones usadas para purificar el sacárido pueden dar como resultado la des-O-acetilación (p. ej., en condiciones básicas), pero es útil retener OAc en esta posición C-3. En algunas realizaciones, al menos 50% (p. ej., al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de los residuos de manosamina en sacáridos de un serogrupo A están O-acetilados en la posición C-3. Los grupos acetilo se pueden sustituir por grupos bloqueantes para evitar la hidrólisis [35], y dichos sacáridos modificados siguen siendo sacáridos del serogrupo A dentro del significado de la invención.

El sacárido capsular del serogrupo C es un homopolímero de ácido siálico con unión (α2→9) (ácido N-acetil-neuramínico o "NeuNAc"). La estructura del sacárido se escribe como →9)-Neu *p* NAc 7/8 OAc- (α2 →. La mayoría de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en C-7 y/o C-8 de los restos de ácido siálico, pero aproximadamente 15% de los aislados clínicos carecen de estos grupos O-acetilo [36,37]. La presencia o ausencia de grupos OAc genera epítopos únicos, y la especificidad de la unión de anticuerpos al sacárido puede afectar a su actividad bactericida frente a cepas O-acetiladas (OAc-) y des-O-acetiladas (OAc+) [38-40]. Los sacáridos del serogrupo C usados con la invención se pueden preparar a partir de cepas OAc+ u OAc- Las vacunas de conjugado MenC autorizadas incluyen sacáridos tanto OAc- (NEISVAC-C™) como OAc+ (MENJUGATET™ y MENINGITECT™). En algunas realizaciones, las cepas para la producción de conjugados del serogrupo C son cepas OAc+, por ejemplo, del serotipo 16, serosubtipo P1.7a, , etc. Por lo tanto, se pueden usar cepas C:16:P1.7a,1 OAc+. Las cepas OAc+ en el serosubtipo P1.1 también son útiles, como la cepa C11. Los sacáridos MenC preferidos se toman de cepas OAc+, tales como la cepa C11.

El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades de disacárido de ácido siálico-galactosa. Al igual que el sacárido del serogrupo C, tiene O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [41]. La estructura se escribe como: → 4) -D-Neu*p*5Ac(7/9OAc)-α-(2→6)-D-Gal-α-(1 →.

El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto que la unidad que se repite en el disacárido incluye glucosa en lugar de galactosa. Al igual que el serogrupo W135, tiene O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [41]. La estructura del serogrupo Y se escribe como: →4)-D-Neu*p*5Ac(7/9OAc)-α-(2→6)-D-Glc-α-(1→.

Los sacáridos usados de acuerdo con la invención pueden estar O-acetilados como se ha descrito antes (p. ej., con el mismo patrón de O-acetilación que se observa en sacáridos capsulares naturales), o pueden estar parcial o totalmente des-O-acetilados en una o más posiciones de los anillos de sacáridos, o pueden estar hiper-O-acetilados en relación con los sacáridos capsulares nativos. Por ejemplo, la referencia 42 describe el uso de sacáridos del serogrupo Y que están más de 80% des-O-acetilados.

Los restos de sacáridos en conjugados meningocócicos pueden comprender sacáridos de longitud completa preparados a partir de meningococos, y/o pueden comprender fragmentos de sacáridos de longitud completos, es decir, los sacáridos pueden ser más cortos que los sacáridos capsulares naturales observados en bacterias. Los sacáridos pueden por lo tanto ser despolimerizados, ocurriendo la despolimerización durante o después de la purificación de sacáridos pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de cadena de los sacáridos. Un método de despolimerización implica el uso de peróxido de hidrógeno [43]. El peróxido de hidrógeno se añade a un sacárido (p. ej., para dar una concentración final de H_2O_2 de 1%), y después la mezcla se incuba (p. ej., a aproximadamente 55ºC) hasta que se ha logrado la reducción de longitud de cadena deseada. Otro método de despolimerización implica la hidrólisis ácida [44]. Se conocen en la técnica otros métodos de despolimerización. Los sacáridos usados para preparar conjugados para usar de acuerdo con la invención se pueden obtener por cualquiera de estos métodos de despolimerización. La despolimerización se puede usar con el fin de proporcionar una longitud de cadena óptima para la inmunogenicidad y/o para reducir la longitud de cadena para la manejabilidad física de los sacáridos. En algunas realizaciones, los sacáridos tienen el siguiente intervalo de grados de polimerización medio (Gp): A=10-20; C=12-22; W135=15-25; Y=15-25. En términos de peso molecular, en lugar de Gp, los intervalos útiles son, para todos los serogrupos: <100 kDa; 5 kDa-75 kDa; 7 kDa-50 kDa; 8 kDa-35 kDa; 12 kDa-25 kDa; 15 kDa-22 kDa. En otras realizaciones, el peso molecular medio para sacáridos de cada uno de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y puede ser más de 50 kDa, por ejemplo, ≥75 kDa, ≥100 kDa, ≥110 kDa, ≥120 kDa, ≥130 kDa, etc. [45], e incluso hasta 1500 kDa, en particular según lo determinado por MALLS. Por ejemplo: un sacárido MenA puede estar en el intervalo de 50-500 kDa, p. ej., 60-80 kDa; un sacárido MenC puede estar en el intervalo de 100-210 kDa; un sacárido MenW135 puede estar en el intervalo de 60-190 kDa, por ejemplo, 120-140 kDa; y/o un sacárido MenY puede estar en el intervalo de 60-190 kDa, p. ej., 150-160 kDa.

Si un componente o composición incluye conjugados tanto de Hib como meningocócicos entonces, en algunas realizaciones, la masa de sacárido de Hib puede ser sustancialmente la misma que la masa de un sacárido de serogrupo meningocócico particular. En algunas realizaciones, la masa de sacárido de Hib será mayor que (p. ej., al menos 1,5x) la masa de un sacárido de serogrupo meningocócico particular. En algunas realizaciones, la masa de sacárido de Hib será menor que (p. ej., al menos 1,5x menos) la masa de un sacárido de serogrupo meningocócico particular.

Cuando una composición incluye sacárido de más de un serogrupo meningocócico, hay una masa media de sacárido por serogrupo. Si se usan masas sustancialmente iguales de cada serogrupo, entonces la masa media será la misma que cada masa individual; donde no se usan masas iguales, entonces la media diferirá, p. ej., con una cantidad de 10:5:5:5 µg para una mezcla MenACWY, la masa media es de 6,25 µg por serogrupo. En algunas realizaciones, la masa de sacárido de Hib será sustancialmente la misma que la masa media de sacárido meningocócico por serogrupo. En algunas realizaciones, la masa de sacárido de Hib será mayor que (p. ej., al menos 1,5x) la masa media de sacárido meningocócico por serogrupo. En algunas realizaciones, la masa de sacárido de Hib será menor que (p. ej., al menos 1,5x) la masa media del sacárido meningocócico por serogrupo [46].

Polipéptidos meningocócicos

El sacárido capsular de serogrupo B de *Neisseria meningitidis* no es un inmunógeno de vacuna útil y, por lo tanto, en su lugar se pueden usar antígenos polipeptídicos. Por ejemplo, se puede usar con la invención la "vacuna universal para el meningococo del serogrupo B" descrita por Novartis Vaccines en la ref. 47.

Una composición de la invención puede incluir un antígeno proteína de unión al factor H (fHBP). El antígeno fHBP se ha caracterizado en detalle. También se conoce como proteína "741" [SEQ ID 2535 y 2536 en la ref. 48], "NMB1870", "GNA1870" [refs. 49-51], "P2086", "LP2086" u "ORF2086" [52-54]. Es naturalmente una lipoproteína y se expresa en todos los serogrupos meningocócicos. El antígeno fHBP se divide en tres variantes distintas [55] y se prefiere incluir antígenos para todas las variantes.

Una composición de la invención puede incluir un antígeno de Neisseria de unión a heparina (NHBA) [56]. Este

antígeno se incluyó en la secuencia de genoma publicada para la cepa meningocócica del serogrupo B MC58 [57] como gen NMB2132.

Una composición de la invención puede incluir un antígeno NadA. El antígeno NadA se incluyó en la secuencia de genoma publicada para la cepa meningocócica del serogrupo B MC58 [57] como gen NMB1994.

Una composición de la invención puede incluir un antígeno NspA. El antígeno NspA se incluyó en la secuencia de genoma publicada para la cepa meningocócica del serogrupo B MC58 [57] como gen NMB0663.

Una composición de la invención puede incluir un antígeno NhhA. El antígeno NhhA se incluyó en la secuencia de genoma publicada para la cepa meningocócica del serogrupo B MC58 [57] como gen NMB0992.

Una composición de la invención puede incluir un antígeno App. El antígeno App se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B [57] como gen NMB1985.

Una composición de la invención puede incluir un antígeno Omp85. Omp85 se incluyó en la secuencia del genoma publicada para la cepa meningocócica del serogrupo B MC58 [57] como gen NMB0182.

Una composición de la invención puede incluir una vesícula de membrana exterior meningocócica.

Sacáridos neumocócicos

Streptococcus pneumoniae causa meningitis bacteriana y las vacunas existentes se basan en sacáridos capsulares. Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden incluir al menos un sacárido capsular neumocócico conjugado con una proteína transportadora.

La invención puede incluir el sacárido capsular de uno o más serotipos neumocócicos diferentes. Cuando una composición incluye antígenos sacáridos de más de un serotipo, estos se preparan preferiblemente por separado, se conjugan por separado y después se combinan. Los métodos para purificar sacáridos capsulares neumocócicos son conocidos en la técnica (p. ej., véase la referencia 58) y las vacunas basadas en sacáridos purificados de 23 serotipos diferentes se conocen desde hace muchos años. También se han descrito mejoras de estos métodos, p. ej., para el serotipo 3 como se describe en la referencia 59, o para los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F y 19A como se describe en la referencia 60.

El(los) sacárido(s) capsular(es) neumocócico(s) se seleccionarán típicamente de 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/o 33F. Por lo tanto, en total, una composición puede incluir un sacárido capsular de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o más serotipos diferentes. Las composiciones que incluyen al menos el sacárido de serotipo 6B son útiles.

Una combinación útil de serotipos es una combinación 7-valente, p. ej., que incluye sacáridos capsulares de cada uno de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Otra combinación útil es una combinación 9-valente, p. ej., que incluye sacárido capsular de cada uno de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Otra combinación útil es una combinación 10-valente, p. ej., que incluye sacárido capsular de cada uno de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Una combinación 11-valente puede incluir además sacárido del serotipo 3. Se puede añadir una combinación 12-valente a la mezcla 10-valente: serotipos 6A y 19A; 6A y 22F; 19A y 22F; 6A y 15B; 19A y 15B; o 22F y 15B. Se puede añadir una combinación 13-valente a la mezcla 11-valente: serotipos 19A y 22F; 8 y 12F; 8 y 15B; 8 y 19A; 8 y 22F; 12F y 15B; 12F y 19A; 12F y 22F; 15B y 19A; 15B y 22F; 6A y 19A, etc.

Por tanto, una combinación 13-valente útil incluye sacárido capsular de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19 (o 19A), 19F y 23F, p. ej., preparado como se describe en las referencias 61 a 64. Una de dichas combinaciones incluye sacárido de serotipo 6B en aproximadamente 8 µg/ml y los otros 12 sacáridos en concentraciones de aproximadamente 4 µg/ml cada uno. Otra de dichas combinaciones incluye sacáridos de serotipo 6A y 6B en aproximadamente 8 µg/ml cada uno y los otros 11 sacáridos en aproximadamente 4 µg/ml de cada uno.

Las proteínas transportadoras adecuadas para conjugados incluyen toxinas bacterianas, tales como toxinas diftéricas o tetánicas, o toxoides o mutantes de los mismos. Estos se usan habitualmente en vacunas conjugadas. Por ejemplo, es útil el mutante de la toxina diftérica CRM197 [65]. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen péptidos sintéticos [66,67], proteínas de choque térmico [68,69], proteínas de pertussis [70,71], citoquinas [72], linfoquinas [72], hormonas [72], factores de crecimiento [72] , proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de linfocitos T $CD4^+$ humanos de diferentes antígenos derivados de patógenos [73] tales como N19 [74], proteína D de *H. influenzae* [75-77], neumolisina [78] o sus derivados no tóxicos [79], proteína de superficie neumocócica PspA [80], proteínas de absorción de hierro [81], toxina A o B de *C. difficile* [82], exoproteína A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) [83], etc.

Las proteínas transportadoras particularmente útiles para las vacunas de conjugados neumocócicos son CRM197, toxoide tetánico, toxoide diftérico y proteína D de *H. influenzae*. CRM197 se usa en PREVNAR™. Una mezcla 13-

valente puede usar CRM197 como la proteína transportadora para cada uno de los 13 conjugados, y CRM197 puede estar presente en aproximadamente 55-60 µg/ml.

Cuando una composición incluye conjugados de más de un serotipo neumocócico, se puede usar la misma proteína transportadora para cada conjugado separado, o usar proteínas transportadoras diferentes. En ambos casos, sin embargo, se formará una mezcla de diferentes conjugados preparando cada conjugado de serotipo por separado, y después mezclándolos para formar una mezcla de conjugados separados. La referencia 84 describe las ventajas potenciales cuando se usan diferentes proteínas transportadoras en vacunas de conjugados neumocócicos multivalentes, pero el producto PREVNAR™ usa con éxito el mismo transportador para cada uno de los siete serotipos diferentes.

Una proteína transportadora se puede conjugar covalentemente con un sacárido neumocócico directamente o por un conector. Se conocen diferentes conectores. Por ejemplo, la unión puede ser por un carbonilo, que se puede formar por reacción de un grupo hidroxilo libre de un sacárido modificado con CDI [85,86] seguido de reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Se puede usar la condensación de carbodiimida [87]. Se puede usar un conector de ácido adípico, que se puede formar acoplando un grupo $-NH_2$ libre (p. ej., introducido en un sacárido por aminación) con ácido adípico (usando, por ejemplo, activación con diimida), y después acoplar una proteína al sacárido-ácido adípico intermedio resultante [88,89]. Otros conectores incluyen β-propionamido [90], nitrofenil-etilamina [91], haluros de halogenoacilo [92], enlaces glucosídicos [93], ácido 6-aminocaproico [94], N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) [95], dihidrazida de ácido adípico ADH [96], restos de C_4 a C_{12} [97], etc.

Se puede usar conjugación por aminación reductora. El sacárido se puede oxidar primero con peryodato para introducir un grupo aldehído, que después puede formar un enlace covalente directo con una proteína transportadora por aminación reductora, p. ej., al grupo ε-amino de una lisina. Si el sacárido incluye múltiples grupos aldehído por molécula, entonces esta técnica de enlace puede conducir a un producto reticulado, donde múltiples aldehídos reaccionan con múltiples aminas del transportador. Esta técnica de conjugación por reticulación es particularmente útil para al menos los serotipos neumocócicos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

Un sacárido neumocócico puede comprender un sacárido intacto de longitud completa preparado a partir de neumococo, y/o puede comprender fragmentos de sacáridos de longitud completa, es decir, los sacáridos pueden ser más cortos que los sacáridos capsulares naturales observados en bacterias. Los sacáridos, por lo tanto, se pueden despolimerizar, ocurriendo la despolimerización durante o después de la purificación de sacáridos pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de cadena de los sacáridos. La despolimerización se puede usar con el fin de proporcionar una longitud de cadena óptima para la inmunogenicidad y/o para reducir la longitud de la cadena para la manejabilidad física de los sacáridos. Cuando se usa más de un serotipo neumocócico, entonces se pueden usar sacáridos intactos para cada serotipo, fragmentos para cada serotipo o usar sacáridos intactos para algunos serotipos y fragmentos para otros serotipos.

Cuando una composición incluye sacárido de cualquiera de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 19F y 23F, estos sacáridos son preferiblemente intactos. Por el contrario, cuando una composición incluye sacárido del serotipo 18C, este sacárido preferiblemente está despolimerizado.

Un sacárido de serotipo 3 también se puede despolimerizar. Por ejemplo, un sacárido de serotipo 3 se puede someter a hidrólisis ácida para la despolimerización [61], p. ej., usando ácido acético. Después, los fragmentos resultantes se pueden oxidar para su activación (p. ej., oxidación con peryodato, puede ser en presencia de cationes bivalentes, p. ej., con $MgCl_2$), conjugar con un transportador (p. ej., CRM197) en condiciones reductoras (p. ej., usando cianoborohidruro de sodio) y después (opcionalmente) cualquier aldehído que no haya reaccionado en el sacárido se puede desactivar (p. ej., usando borohidruro de sodio) [61]. La conjugación se puede realizar en material liofilizado, p. ej., después de la co-liofilización del sacárido activado y el transportador.

Un sacárido de serotipo 1 se puede des-O-acetilar al menos parcialmente, p. ej., se consigue por tratamiento con tampón de pH alcalino [62] tal como usando un tampón de bicarbonato/carbonato. Dichos sacáridos des-O-acetilados (parcialmente) se pueden oxidar para la activación (p. ej., oxidación con peryodato), conjugar con un transportador (p. ej., CRM197) en condiciones reductoras (p. ej., usando cianoborohidruro sódico), y después (opcionalmente) cualquier aldehído sin reaccionar en el sacárido se puede desactivar (p. ej., usando borohidruro de sodio) [62]. La conjugación se puede llevar a cabo en material liofilizado, p. ej., después de la co-liofilización del sacárido activado y el vehículo.

Un sacárido de serotipo 19A se puede oxidar para su activación (ej. oxidación con peryodato), conjugar con un transportador (p. ej., CRM197) en DMSO en condiciones reductoras y después (opcionalmente) cualquier aldehído sin reaccionar en el sacárido se puede desactivar (p. ej., usando borohidruro sódico) [98]. La conjugación se puede llevar a cabo en material liofilizado, p. ej., después de la co-liofilización del sacárido activado y el transportador.

Pueden estar presentes uno o más conjugados de sacárido capsular neumocócico en forma liofilizada.

Los conjugados neumocócicos pueden, idealmente, producir anticuerpos anticapsulares que se unen al sacárido relevante, p. ej., producen un nivel de anticuerpo antisacárido ≥ 0,20 µg/ml [99]. Los anticuerpos se pueden evaluar por inmunoensayo enzimático (EIA) y/o medición de la actividad opsonofagocítica (OPA). El método de EIA ha sido

ampliamente validado y existe una conexión entre la concentración de anticuerpo y la eficacia de la vacuna.

Adyuvantes de sal de aluminio

Las composiciones de la invención incluyen un adyuvante de sal de aluminio.

Los adyuvantes de sal de aluminio actualmente en uso típicamente se mencionan como adyuvantes de "hidróxido de aluminio" o de "fosfato de aluminio". Sin embargo, estos son nombres de conveniencia, ya que ninguno de los dos es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (p. ej., véase el capítulo 9 de la referencia 100). La invención puede usar cualquiera de las sales de "hidróxido" o "fosfato" que sean útiles como adyuvantes. Las sales de aluminio que incluyen iones hidróxido son las sales metálicas insolubles preferidas para usar con la presente invención ya que estos iones hidróxido pueden experimentar fácilmente un intercambio de ligandos para la adsorción de antígenos y/o agonistas de TLR. Por lo tanto, las sales preferidas para la adsorción de agonistas de TLR son hidróxido de aluminio y/o hidroxifosfato de aluminio. Estos tienen restos hidroxilo superficiales que pueden experimentar fácilmente el intercambio de ligandos con grupos que contienen fósforo (p. ej., fosfatos, fosfonatos) para proporcionar una adsorción estable. Lo más preferido es un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que son normalmente al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que se puede representar por la fórmula AlO(OH), se puede distinguir de otros compuestos de aluminio, como el hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$, por espectroscopía infrarroja (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción a 1070 cm^{-1} y un hombro fuerte a 3090-3100 cm^{-1} (capítulo 9 de la ref. 100). El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por la anchura de la banda de difracción a media altura (WHH), con partículas poco cristalinas que muestran un mayor ensanchamiento de línea debido a tamaños de cristalitos más pequeños. El área superficial aumenta a medida que aumenta la WHH, y se ha visto que los adyuvantes con valores de WHH mayores tienen una mayor capacidad para la adsorción de antígenos. Una morfología fibrosa (p. ej., como se ve en las micrografías electrónicas de transmisión) es típica para los adyuvantes de hidróxido de aluminio, p. ej., con partículas similares a agujas con diámetros de aproximadamente 2 nm. El PZC de adyuvantes de hidróxido de aluminio es típicamente de aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han descrito capacidades de adsorción de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo también contienen una pequeña cantidad de sulfato. Se pueden obtener por precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de hidroxilo por fosfato en la sal. Los hidroxifosfatos en general tienen una relación molar PO_4/Al entre 0,3 y 0,99. Los hidroxifosfatos se pueden distinguir de $AlPO_4$ estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro de IR a 3164 cm^{-1} (p. ej. cuando se calienta a 200ºC) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de la referencia 100).

La relación molar PO_4/Al^{3+} de un adyuvante de fosfato de aluminio en general estará entre 0,3 y 1,2, preferiblemente entre 0,8 y 1,2, y más preferiblemente 0,95 ± 0,1. El fosfato de aluminio generalmente será amorfo, en particular para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es el hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluido en 0,6 mg de Al^{3+}/ml. El fosfato de aluminio en general estará en partículas. Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5-20 µm (p. ej., aproximadamente 5-10 µm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han descrito capacidades de adsorción de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para los adyuvantes de fosfato de aluminio.

El PZC del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución de hidroxilo por fosfato, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y la concentración de los reaccionantes usados para preparar la sal por precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato = PZC más ácido) o añadiendo un tampón tal como un tampón de histidina (hace el PZC más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención en general tendrán un PZC entre 4,0 y 7,0, más preferiblemente entre 5,0 y 6,5, p. ej. aproximadamente 5,7.

En solución, los adyuvantes tanto de fosfato como de hidróxido de aluminio tienden a formar agregados porosos estables de 1-10 µm de diámetro [101].

Una composición puede incluir una mezcla tanto de un hidróxido de aluminio como un fosfato de aluminio, y los componentes pueden adsorberse a una o a ambas de estas sales.

Una solución de fosfato de aluminio usada para preparar una composición de la invención puede contener un tampón (p. ej., un fosfato o una histidina o un tampón Tris), pero esto no siempre es necesario. La solución de fosfato de aluminio preferiblemente es estéril y está exenta de pirógenos. La solución de fosfato de aluminio puede incluir iones fosfato acuosos libres, p. ej., presentes en una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferiblemente entre 5 y 15 mM, y más preferiblemente aproximadamente 10 mM. La solución de fosfato de aluminio también puede comprender cloruro de sodio. La concentración de cloruro de sodio está preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 100 mg/ml (p. ej., 0,5-50 mg/ml, 1-20 mg/ml, 2-10 mg/ml) y es más preferiblemente de aproximadamente 3 ± 1 mg/ml. La

presencia de NaCl facilita la medición correcta del pH antes de la adsorción de antígenos.

Las composiciones de la invención incluyen de 10 µg a menos de 0,2 mg de Al^{+++} por dosis unitaria, p. ej., <150 µg, <100 µg, <75 µg, <50 µg, <25 µg, etc.

Las composiciones de la invención tienen una concentración de Al^{+++} de 20 µg/ml a por debajo de 0,4 mg/ml, p. ej., <300 µg/ml, <250 µg/ml, <200 µg/ml, <150 µg/ml, <100 µg/ml, <75 µg/ml, < 50 µg/ml, etc.

Cuando las composiciones de la invención incluyen un adyuvante basado en aluminio, puede producirse la sedimentación de los componentes durante el almacenamiento. Por lo tanto, la composición debe agitarse antes de la administración a un paciente. La composición agitada será una suspensión blanca turbia.

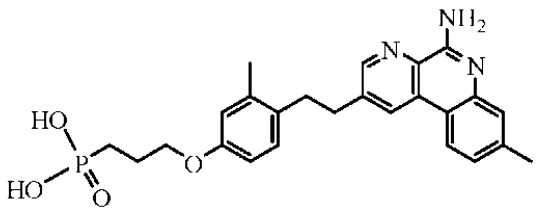
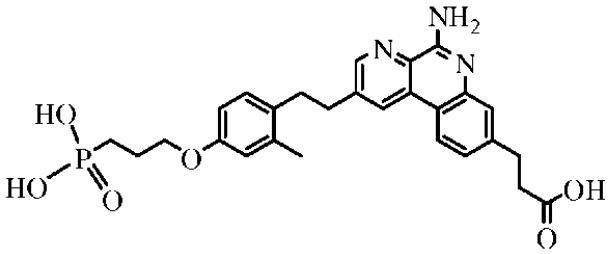
Agonistas de receptores similares a Toll

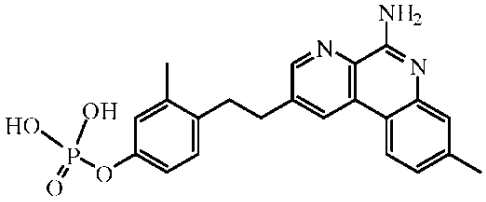
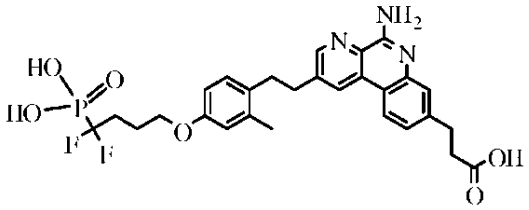
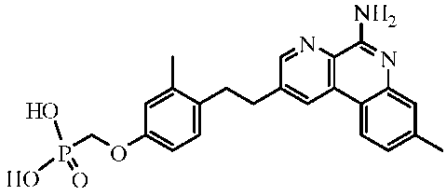
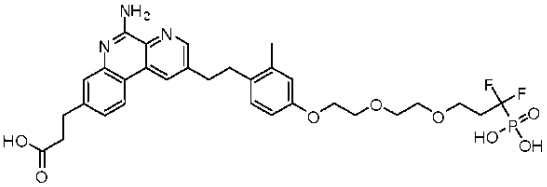
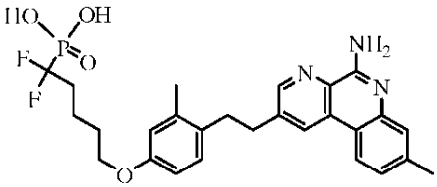
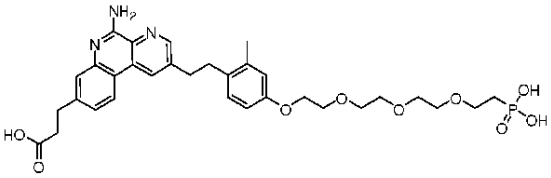
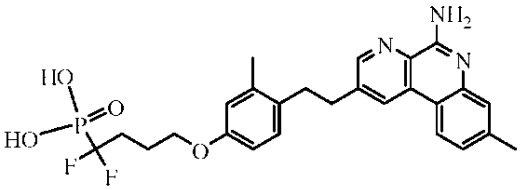
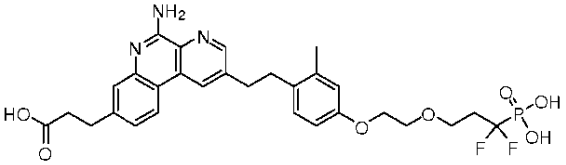
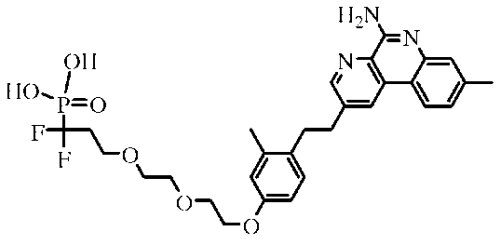
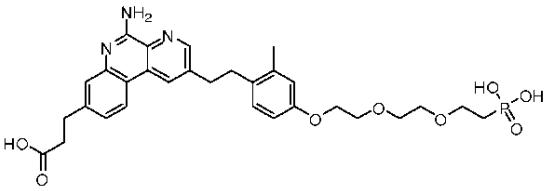
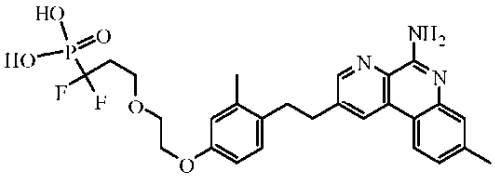
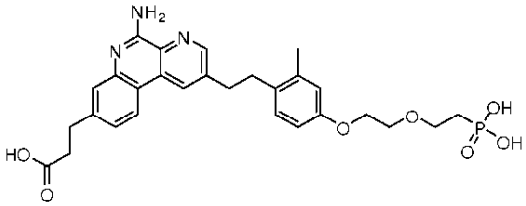
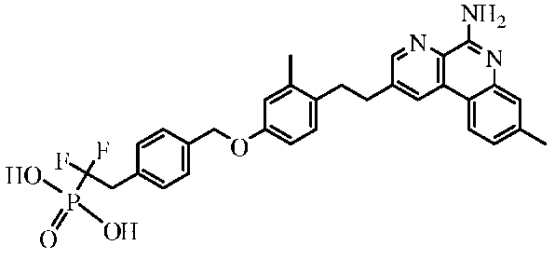
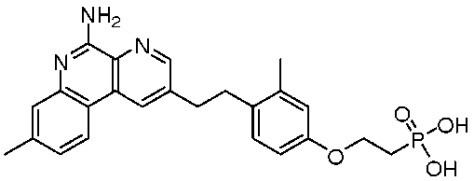
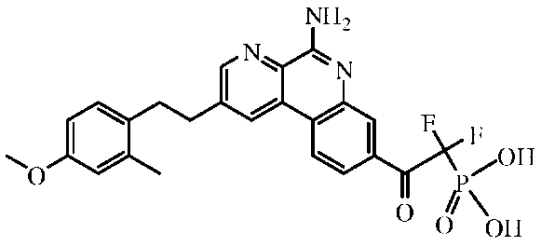
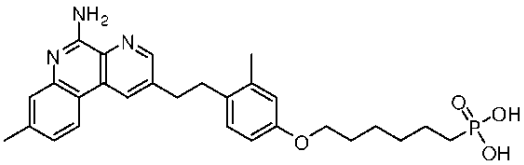
Cuando las composiciones incluyen un adyuvante de sal de aluminio, entonces se puede adsorber un agonista de TLR a esa sal de aluminio, mejorando así el efecto inmunopotenciador del adyuvante [102]. Esto puede conducir a una mejor respuesta inmunitaria y/o permite una reducción en la cantidad de aluminio en la composición mientras se mantiene un efecto adyuvante equivalente.

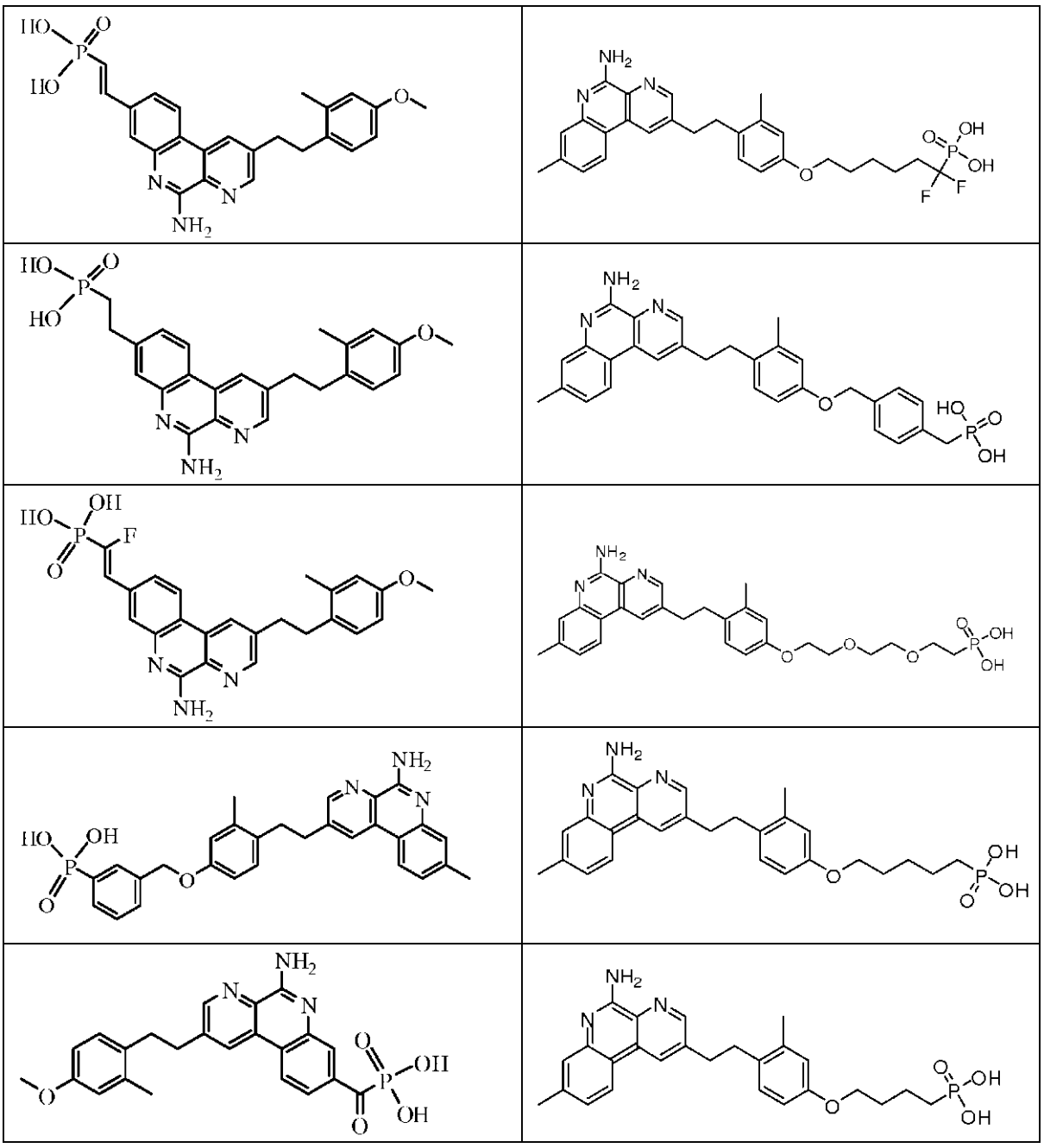
Por lo tanto, las composiciones de la invención incluyen una sal de aluminio (preferiblemente un hidróxido de aluminio) a la que se adsorbe un agonista de TLR7 (más preferiblemente un agonista de TLR7 humano). El agonista y la sal pueden formar un complejo adyuvante estable que retiene la capacidad de la sal de adsorber antígenos.

Los agonistas de TLR con propiedades de adsorción incluyen típicamente un resto que contiene fósforo que puede experimentar un intercambio de ligando con grupos de superficie en una sal de aluminio, p. ej., con grupos de hidróxido de superficie. Por lo tanto, un agonista de TLR útil puede incluir un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un fosfonito, un fosfinito, un fosfato, etc. Los agonistas de TLR7 para usar en la invención incluyen al menos un grupo fosfato o fosfonato [102].

Los agonistas de TLR2 y TLR7 adsorbentes útiles se describen en las referencias 102 a 106. Los agonistas de TLR7 adsorbentes específicos de interés incluyen, pero no se limitan a los compuestos 1A a 27A en la Tabla A en las páginas 79-84 de la referencia 107. Por ejemplo, el agonista de TLR7 puede ser uno de:



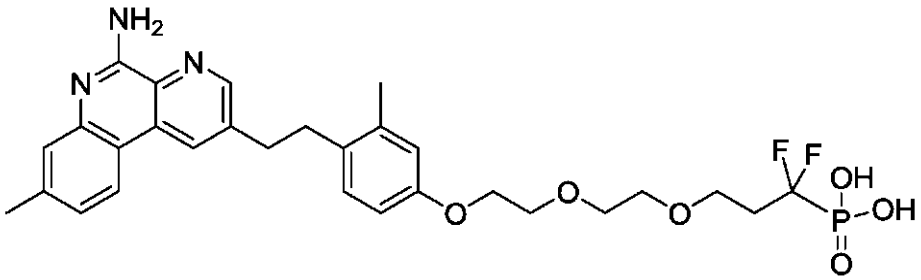
Estos compuestos se pueden adsorber sobre adyuvantes de sal de aluminio por simple mezcla.

A modo de ejemplo, el compuesto (1 mg/ml) se puede disolver en NaOH 10 mM y añadir a una suspensión de adyuvante de hidróxido de aluminio (2 mg/ml) para dar una concentración final de agonista de TLR de 100 µg/dosis. Preferiblemente, se añaden 0,1 mg/ml, más preferiblemente 0,01 mg/ml del compuesto a 2 mg/ml de hidróxido de aluminio.

La relación en masa de sal de aluminio a agonista de TLR7 está entre 2:1 y 400:1, preferiblemente 20:1, más preferiblemente 200:1. La incubación a temperatura ambiente durante 1 hora normalmente es suficiente para >90% de adsorción. La adsorción puede tener lugar en un intervalo de pH, p. ej., de 6,5 a 9. En una realización preferida, se preparan una sal de aluminio y el agonista de TLR7 en tampón de histidina, p. ej., tampón de histidina entre 5-20 mM (tal como 10 mM), de forma conveniente a pH 6,5. Para la adsorción óptima de antígeno sobre el hidróxido de aluminio, el pH debe estar en el intervalo entre 6,0 y 6,5. El pH también es importante para la integridad y estabilidad de los antígenos, y en el caso de los antígenos proteínas, para su plegamiento adecuado en la formulación final de

la vacuna.

Un agonista de TLR7 útil, que se usa en los ejemplos a continuación, es el "compuesto T" (compuesto 6A en la página 80 de la referencia 107). Tiene una solubilidad de aproximadamente 4 mg/ml en agua y se adsorbe bien al hidróxido de aluminio:



En general, la relación en peso de agonista de TLR7 al Al^{+++} será menor que 5:1, p. ej., menor que 4:1, menor que 3:1, menor que 2:1, o menor de 1:1. Por lo tanto, por ejemplo, con una concentración de Al^{+++} de 0,5 mg/ml, la concentración máxima del agonista de TLR sería de 2,5 mg/ml. Pero se pueden usar niveles mayores o menores. Es típica una masa menor de agonista de TLR que de Al^{+++}, p. ej., por dosis, 100 µg de agonista de TLR con 0,2 mg de Al^{+++}, etc.

La cantidad de agonista de TLR en una dosis unitaria estará en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos rutinarios. Se puede usar una cantidad de 1-1000 µg/dosis, p. ej., de 5-100 µg por dosis o de 10-100 µg por dosis, e idealmente ≤300 µg por dosis, p. ej., aproximadamente 5 µg, 10 µg, 20 µg, 25 µg, 50 µg o 100 µg por dosis. Por lo tanto, la concentración de un agonista de TLR en una composición de la invención puede ser de 2-2000 µg/ml, p. ej., de 10-200 µg/ml, o aproximadamente 5, 10, 20, 40, 50, 100 o 200 µg/ml, e idealmente ≤600 µg/ml.

Se prefiere que al menos el 50% (en masa) de un agonista en la composición se adsorba a la sal metálica, p. ej., ≥60%, ≥70%, ≥80%, ≥85%, ≥90%, ≥92%, ≥94%, ≥95%, ≥96%, ≥97%, ≥98%, ≥99% o incluso 100%.

Cuando una composición de la invención también incluye un tampón, se prefiere que la concentración de cualesquiera iones fosfato en el tampón sea inferior a 50 mM (p. ej., entre 1 - 15 mM) ya que una alta concentración de iones fosfato puede causar desorción. Se prefiere el uso de un tampón de histidina.

Adyuvantes de emulsión de aceite en agua

Se sabe que las emulsiones de aceite en agua son adyuvantes útiles, p. ej., tanto MF59 como AS03 están presentes en vacunas autorizadas en Europa. Se conocen diferentes adyuvantes de emulsión útiles, y típicamente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el(los) aceite(s) y tensioactivo(s) biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotitas de aceite en la emulsión en general tienen un diámetro submicrométrico, alcanzándose estos pequeños tamaños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren gotas con un tamaño inferior a 220 nm, ya que se pueden someter a esterilización por filtración.

La invención se puede usar con aceites tales como los de una fuente animal (tal como pescado) o vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ilustran los aceites de nueces. Se puede usar aceite de jojoba, p. ej., obtenido de semilla de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también se puede usar el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticale y similares. Los ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se encuentran de forma natural en aceites de semillas, se pueden preparar por hidrólisis, separación y esterificación de los materiales adecuados a partir de los aceites de nueces y semillas. Las grasas y los aceites de la leche de mamífero son metabolizables y, por lo tanto, se pueden usar en la práctica de esta invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros a partir de fuentes animales son bien conocidos en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, los aceites de hígado de tiburón y el aceite de ballena, tal como el esperma de ballena, ilustran varios de los aceites de pescado que se pueden usar en la presente memoria. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y en general se denominan terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide ramificado, insaturado, conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,12,22-tetracosahexaeno, que es particularmente preferido en la presente memoria. El escualeno, el análogo saturado del escualeno, es también un aceite preferido Los aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, se obtienen fácilmente de fuentes comerciales o se pueden obtener por métodos conocidos

en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Se pueden usar mezclas de aceites.

Los tensioactivos se pueden clasificar por su "HLB" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferiblemente al menos 15, y más preferiblemente al menos 16. La invención se puede usar con tensioactivos que incluyen, pero no se limitan a: los tensioactivos de ésteres de sorbitán polioxietilénico (comúnmente denominados Tweens), en especial polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) y/u óxido de butileno (BO), vendidos bajo el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros de bloques EO/PO lineales; octoxinoles, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiilo) que se repiten, siendo de particular interés el octoxinol-9 (Triton X-100 o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilados de nonilfenol, tales como la serie Tergitol™ NP; éteres grasos polioxietilénicos derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como los SPAN), tales como el trioleato de sorbitán (Span 85) y el monolaurato de sorbitán. Se prefieren tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son polisorbato 80 (monooleato de sorbitán polioxietilénico, Tween 80), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

Se pueden usar mezclas de tensioactivos, p. ej., mezclas de Tween 80/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de sorbitán polioxietilénico tal como monooleato de sorbitán polioxietilénico (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de sorbitán polioxietilénico y/o un octoxinol.

Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de sorbitán polioxietilénico (tales como polisorbato 80) de 0,01 a 1%, en particular aproximadamente 0,1%; octil o nonilfenoxi-polioxietanoles (tales como Triton X-100, u otros detergentes en la serie Triton) de 0,001 a 0,1%, en particular de 0,005 a 0,02%; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) de 0,1 a 20%, preferiblemente de 0,1 a 10% y en particular de 0,1 a 1% o aproximadamente 0,5%.

Adyuvantes de emulsión de aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión submicrométrica de escualeno, polisorbato 80 y trioleato de sorbitán. La composición de la emulsión en volumen puede ser aproximadamente 5% de escualeno, aproximadamente 0,5% de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5% de trioleato de sorbitán. En términos de peso, estas proporciones se convierten en 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,48% de trioleato de sorbitán. Este adyuvante se conoce como "MF59" [108-110], como se describe con más detalle en el capítulo 10 de la ref. 100 y el capítulo 12 de la ref. 111. La emulsión de MF59 incluye ventajosamente iones de citrato, p. ej., tampón de citrato de sodio 10 mM.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y polisorbato 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir trioleato de sorbitán (p. ej., al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de 2 a 10% de escualeno, de 2 a 10% de tocoferol y de 0,3 a 3% de polisorbato 80, y la relación en peso de escualeno:tocoferol es preferiblemente ≤1 (p. ej., 0,90) ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y el polisorbato 80 pueden estar presentes en una relación en volumen de aproximadamente 5:2, o en una relación en peso de aproximadamente 11:5. Por lo tanto, los tres componentes (escualeno, tocoferol, polisorbato 80) pueden estar presentes en una relación en peso de 1068:1186:485 o aproximadamente de 55:61:25. Una de dichas emulsiones ("AS03") se puede preparar disolviendo polisorbato 80 en PBS para dar una solución al 2%, después mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL-α-tocoferol y 5 ml de escualeno), y después microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, p. ej., con un diámetro medio de entre 100 y 250 nm, preferiblemente de aproximadamente 180 nm. La emulsión también puede incluir un monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3d-MPL). Otra emulsión útil de este tipo puede comprender, por dosis humana, 0,5-10 mg de escualeno, 0,5-11 mg de tocoferol y 0,1-4 mg de polisorbato 80 [112], p. ej., en las proporciones analizadas anteriormente.

Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (p. ej., Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La emulsión puede contener un tampón de fosfato.

- Una emulsión que comprende un polisorbato (p. ej., polisorbato 80), un detergente Triton (p. ej., Triton X-100) y un tocoferol (p. ej., un succinato de α-tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación en masa de aproximadamente 75:11:10 (p. ej., 750 µg/ml de polisorbato 80, 110 µg/ml de Triton X-100 y 100 µg/ml de succinato de α-tocoferol), y estas concentraciones deberían incluir cualquier contribución de estos componentes de los antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La fase acuosa puede contener un tampón de fosfato.

- Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión se puede formular en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de suministro útil para los dipéptidos de muramilo, y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [113] (0,05-1% de Thr-MDP, 5% de escualano, 2,5% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). También se puede usar sin el Thr-MDP, como en el adyuvante

"AF" [114] (5% de escualano, 1,25% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere microfluidización.

- Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de éter de alquilo polioxietilénico (p. ej., éter de cetoestearilo polioxietilénico (12)) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (p. ej., un éster de sorbitán o manida, tal como monoleato de sorbitán o "Span 80"). La emulsión es preferiblemente termorreversible y/o tiene al menos el 90% de las gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [115]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (p. ej., un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglucósido. También puede incluir un agonista de TLR4, tal como uno cuya estructura química no incluye un anillo de azúcar [116]. Dichas emulsiones se pueden liofilizar.

-Una emulsión que tiene de 0,5 a 50% de un aceite, 0,1-10% de un fosfolípido y 0,05 a 5% de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 117, los componentes de fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños de gotas submicrométricas son ventajosos.

- Una emulsión submicrométrica de aceite en agua de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (como lecitina, polisorbato 80 o Span 80). Se pueden incluir aditivos, como saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 118, producido por adición de amina alifática a desacilsaponina por el grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina.

- Una emulsión en la que una saponina (p. ej., QuilA o QS21) y un esterol (p. ej., un colesterol) se asocian como micelas helicoidales [119].

- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico y un tensioactivo hidrófilo no iónico (p. ej., un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno) [120].

- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico y un tensioactivo lipófilo no iónico (p. ej., un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno) [120].

Las emulsiones de aceite en agua preferidas usadas con la invención comprenden escualeno y/o polisorbato 80.

Las emulsiones se pueden mezclar con antígenos durante la fabricación, o se pueden mezclar de forma extemporánea en el momento de la administración. Por lo tanto, el adyuvante y el antígeno se pueden mantener por separado en una vacuna envasada o distribuida, lista para la formulación final en el momento del uso. El antígeno generalmente estará en forma acuosa, de modo que la vacuna finalmente se prepara mezclando dos líquidos. La relación en volumen de los dos líquidos para mezclar puede variar (p. ej., entre 5:1 y 1:5), pero en general es de aproximadamente 1:1. Si la emulsión y el antígeno se almacenan por separado en un kit multidosis (del que pueden tomarse múltiples dosis unitarias), entonces el producto se puede presentar como un vial que contiene emulsión y un vial que contiene antígeno acuoso, para mezclar y obtener una vacuna líquida con adyuvante.

Cuando se usa para formular una vacuna, MF59 se mezcla preferiblemente con antígenos en solución salina tamponada con fosfato para preservar la estabilidad a largo plazo de las formulaciones de MF59 y para garantizar valores fisiológicos de pH y osmolaridad en la vacuna final. Esta mezcla puede tener una relación en volumen 1:1. El PBS puede tener un pH de 7,2.

Cuando una composición incluye un tocoferol, se puede usar cualquiera de los tocoferoles α, β, γ, δ, ε, o ξ, pero se prefieren los α-tocoferoles. El tocoferol puede tener varias formas, p. ej., diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. Se pueden usar tanto D-α-tocoferol como DL-α-tocoferol. Los tocoferoles se incluyen ventajosamente en vacunas para usar en pacientes de edad avanzada (p. ej., de 60 años o mayores) porque se ha descrito que la vitamina E tiene un efecto positivo en la respuesta inmunitaria en este grupo de pacientes. También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [121]. Un α-tocoferol preferido es el DL-α-tocoferol, y la sal preferida de este tocoferol es el succinato. Se ha encontrado que la sal de succinato coopera con ligandos relacionados con TNF in vivo.

Composiciones inmunógenas

Las composiciones de la invención pueden comprender: (a) un componente antigénico; y (b) un componente no antigénico. El componente antigénico puede comprender o consistir en los antígenos descritos antes. El componente no antigénico puede incluir vehículos, adyuvantes, excipientes, tampones, etc. Estos componentes no antigénicos pueden tener diferentes fuentes. Por ejemplo, pueden estar presentes en uno de los materiales antigénicos o adyuvantes que se usan durante la fabricación o se pueden añadir por separado de esos componentes.

Las composiciones preferidas de la invención incluyen uno o más vehículo(s) farmacéutico(s) y/o excipiente(s).

Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere cloruro sódico

(NaCl), que puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml.

Las composiciones en general tendrán una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferiblemente entre 240-360 mOsm/kg, y estarán más preferiblemente dentro del intervalo de 280-320 mOsm/kg. Se había descrito previamente que la osmolalidad no tiene un impacto sobre el dolor causado por la vacunación [122], pero se prefiere, no obstante, mantener la osmolalidad en este intervalo.

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato; un tampón Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina; o un tampón de citrato. Los tampones típicamente se incluirán en el intervalo de 5-20 mM.

Una composición de la invención puede estar sustancialmente exenta de tensioactivos (antes de mezclar con cualquier adyuvante de emulsión). En particular, la composición de la invención puede estar sustancialmente exenta de polisorbato 80, p. ej., contiene menos de 0,1 µg/ml de polisorbato 80, y preferiblemente no contiene polisorbato 80 detectable. Sin embargo, cuando una composición incluye HBsAg, normalmente incluirá polisorbato 20 p. ej., si se usó durante la rotura de la levadura [29].

El pH de una composición de la invención en general estará entre 6,0 y 7,5. Un procedimiento de fabricación puede, por lo tanto, incluir una etapa de ajuste del pH de una composición antes del acondicionamiento. Las composiciones acuosas administradas a un paciente pueden tener un pH entre 5,0 y 7,5, y más típicamente entre 5,0 y 6,0 para una estabilidad óptima; cuando está presente un toxoide diftérico y/o toxoide tetánico, el pH idealmente está entre 6,0 y 7,0.

Las composiciones de la invención son preferiblemente estériles.

Las composiciones de la invención son preferiblemente no pirogénicas, p. ej., contienen <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar; 1 UE es igual a 0,2 ng de estándar de referencia de endotoxina EC-2 "RSE" de la FDA) por dosis, y preferiblemente <0,1 UE por dosis.

Las composiciones de la invención preferiblemente están exentas de gluten.

Debido a la naturaleza adsorbida de los antígenos, un producto de vacuna puede ser una suspensión con un aspecto turbio. Este aspecto significa que la contaminación microbiana no es fácilmente visible, y por lo tanto la vacuna preferiblemente contiene un agente antimicrobiano. Esto es particularmente importante cuando la vacuna se acondiciona en envases multidosis. Los antimicrobianos preferidos para la inclusión son 2-fenoxietanol y timerosal. Sin embargo, se prefiere no usar conservantes mercuriales (p. ej., timerosal). Por lo tanto, entre 1 y todos los componentes pueden estar sustancialmente exentos de conservante mercurial. Sin embargo, la presencia de cantidades en trazas puede ser inevitable si un componente se ha tratado con dicho conservante antes de ser usado en la invención. Por seguridad, sin embargo, se prefiere que la composición final contenga menos de aproximadamente 25 ng/ml de mercurio. Más preferiblemente, el producto de vacuna final no contiene timerosal detectable. Esto se conseguirá en general retirando el conservante mercurial de una preparación de antígeno antes de su adición en el procedimiento de la invención o evitando el uso de timerosal durante la preparación de los componentes usados para preparar la composición. Se prefieren las composiciones sin mercurio.

Las composiciones de la invención en general estarán en forma acuosa.

Durante la fabricación, la dilución de los componentes para dar las concentraciones finales deseadas normalmente se realizará con API (agua para inyección).

La invención puede proporcionar material a granel que es adecuado para el acondicionamiento en dosis individuales, que después se pueden distribuir para administración a pacientes. Las concentraciones descritas antes son típicamente concentraciones en la dosis envasada final, y por lo tanto las concentraciones en la vacuna a granel pueden ser más altas (p. ej., para reducir a las concentraciones finales por dilución).

Las composiciones de la invención se administran preferiblemente a pacientes en dosis unitarias de 0,5 ml. Se entenderá que las referencias a dosis de 0,5 ml incluyen una varianza normal, p. ej., 0,5 ml ± 0,05 ml. Para situaciones de dosis múltiples, se extraerán cantidades múltiples de dosis y se envasarán juntas en un solo recipiente, p. ej., 5 ml para un recipiente multidosis de 10 dosis (o 5,5 ml con un sobrellenado de 10%).

El material residual de componentes antigénicos individuales también puede estar presente en cantidades en trazas en la vacuna final producida por el procedimiento de la invención. Por ejemplo, si se usa formaldehído para preparar los toxoides diftérico, tetánico y pertussis, después el producto de vacuna final puede retener cantidades en trazas de formaldehído (p. ej., menos de 10 µg/ml, preferiblemente <5 µg/ml). Se pueden haber usado medios o estabilizantes durante la preparación de poliovirus (p. ej., Medio 199), y estos se pueden arrastrar hasta la vacuna final. Del mismo modo, aminoácidos libres (p. ej., alanina, arginina, aspartato, cisteína y/o cistina, glutamato, glutamina, glicina, histidina, prolina y/o hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina y/o valina), vitaminas (p. ej., colina, ascorbato, etc.), fosfato disódico, fosfato monopotásico, calcio, glucosa, sulfato de adenina, rojo fenol, acetato sódico, cloruro potásico, etc. pueden estar

retenidos en la vacuna final en ≤100 µg/ml, preferiblemente <10 µg/ml, cada uno. Otros componentes de las preparaciones de antígenos, tales como neomicina (p. ej., sulfato de neomicina, en particular de un componente de poliovirus), polimixina B (p. ej., sulfato de polimixina B, en particular de un componente de poliovirus), etc. también pueden estar presentes en cantidades de subnanogramos por dosis. Un posible componente adicional de la vacuna final que se origina en las preparaciones de antígeno procede de una purificación de antígenos menor que la total. Pueden estar presentes pequeñas cantidades de proteínas y/o ADN genómico de *B. pertussis, C. diphtheriae, C. tetani* y *S. cerevisiae*. Para minimizar las cantidades de estos componentes residuales, las preparaciones de antígeno se tratan preferiblemente para eliminarlas antes de que los antígenos se usen con la invención.

Cuando se usa un componente de poliovirus, generalmente se habrá cultivado en células Vero. La vacuna final preferiblemente contiene menos de 10 ng/ml, preferiblemente ≤1 ng/ml, p. ej., ≤500 pg/ml o ≤50 pg/ml de ADN de células Vero, p. ej. menos de 10 ng/ml de ADN de células Vero, es decir ≥50 pares de bases de longitud.

Las composiciones de la invención se presentan para usar en envases. Los envases adecuados incluyen viales y jeringas desechables (preferiblemente estériles). Los procedimientos para preparar las composiciones de la invención pueden comprender una etapa de acondicionamiento de la vacuna en envases para su uso. Los envases adecuados incluyen viales y jeringas desechables (preferiblemente estériles).

Cuando se presenta una composición de la invención en un vial, ésta preferiblemente está hecha de un material de vidrio o plástico. El vial preferiblemente se esteriliza antes de que se le añada la composición. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales se pueden sellar con un tapón sin látex. El vial puede incluir una sola dosis de vacuna, o puede incluir más de una dosis (un vial de "multidosis"), p. ej., 10 dosis. Cuando se usa un vial multidosis, cada dosis debe retirarse con una aguja y jeringa estériles en condiciones asépticas estrictas, teniendo cuidado de evitar la contaminación del contenido del vial. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro.

Un vial puede tener una tapa (p. ej., un cierre Luer) adaptada de modo que se puede insertar una jeringa precargada en la tapa, el contenido de la jeringa se puede expulsar al vial (p. ej., para reconstituir el material liofilizado en el mismo) y el contenido del vial se puede llevar de nuevo a la jeringa. Después de retirar la jeringa del vial, se puede unir entonces una aguja y la composición se puede administrar a un paciente. La tapa se encuentra preferiblemente dentro de un sello o cubierta, de modo que el sello o cubierta deben ser retirados antes de que se pueda acceder a la tapa.

Cuando la composición se envasa en una jeringa, la jeringa normalmente no tendrá una aguja unida a ella, aunque se puede suministrar una aguja separada con la jeringa para ensamblar y usar. Se prefieren agujas de seguridad. Son típicas las agujas de 25,4 mm (1 pulgada) 23 gauge, 25,4 mm (1 pulgada) 25 gauge y 16 mm (5/8 pulgadas) 25 gauge. Las jeringas pueden estar provistas de etiquetas que se despegan en las que se pueden imprimir el número de lote y la fecha de caducidad del contenido, para facilitar el mantenimiento de registros. El émbolo en la jeringa preferiblemente tiene un tope para evitar que el émbolo salga accidentalmente durante la aspiración. Las jeringas pueden tener un tapón y/o émbolo de caucho de látex. Las jeringas desechables contienen una sola dosis de vacuna. La jeringa en general tendrá un tapón del cono para sellar el cono antes de la unión de una aguja, y el tapón del cono está hecho preferiblemente de caucho de butilo. Si la jeringa y la aguja se envasan por separado, entonces la aguja preferiblemente está provista de una protección de goma de butilo. Se prefiere caucho de butilo gris. Las jeringas preferidas son las comercializadas con el nombre comercial "Tip-Lok"™.

Cuando se usa un recipiente de vidrio (p. ej., una jeringa o un vial), entonces se prefiere usar un recipiente hecho de un vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio sódico-cálcico.

Después de envasar una composición en un recipiente, el recipiente puede encerrarse dentro de una caja para su distribución, p. ej., dentro de una caja de cartón, y la caja se etiquetará con detalles de la vacuna, p. ej., su nombre comercial, una lista de los antígenos de la vacuna (p. ej., "hepatitis B recombinante", etc.), el recipiente de presentación (p. ej., "Jeringas desechables precargadas Tip-Lok" o "viales monodosis 10 x 0,5 ml"), su dosis (p. ej., "cada uno contiene una dosis de 0,5 ml"), advertencias (p. ej., “Solo para uso en adultos” o “Solo para uso pediátrico”), una fecha de caducidad, una indicación, un número de patente, etc. Cada caja puede contener más de una vacuna envasada, p. ej., cinco o diez vacunas envasadas (en particular para viales).

La vacuna se puede envasar junto (p. ej., en la misma caja) con un prospecto que incluye detalles de la vacuna, p. ej., instrucciones para la administración, detalles de los antígenos dentro de la vacuna, etc. Las instrucciones también pueden contener advertencias, p. ej., tener una solución de adrenalina fácilmente disponible en caso de reacción anafiláctica después de la vacunación, etc.

La vacuna envasada se almacena preferiblemente entre 2ºC y 8ºC. No debe congelarse.

Las vacunas se pueden proporcionar en forma líquida completa (es decir, cuando todos los componentes antigénicos están en solución o suspensión acuosa) después de la fabricación, o se pueden preparar en una forma que la vacuna se pueda preparar extemporáneamente en el momento/punto de uso mezclando dos componentes entre sí. Dichas realizaciones de dos componentes incluyen la mezcla líquido/líquido y la mezcla líquido/sólido, p. ej., mezclando material acuoso con material liofilizado. Por ejemplo, en una realización, se puede preparar una vacuna mezclando: (a) un primer componente que comprende antígenos y/o adyuvantes acuosos; y (b) un segundo

componente que comprende antígenos liofilizados. En otra realización, se puede preparar una vacuna mezclando: (a) un primer componente que comprende antígenos y/o adyuvantes acuosos; y (b) un segundo componente que comprende antígenos acuosos. En otra realización, se puede preparar una vacuna mezclando: (a) un primer componente que comprende antígenos acuosos; y (b) un segundo componente que comprende un adyuvante acuoso. Los dos componentes están preferiblemente en recipientes separados (p. ej., viales y/o jeringas), y la invención proporciona un kit que comprende los componentes (a) y (b).

Otro formato líquido/liofilizado útil comprende (a) un adyuvante de emulsión de aceite en agua y (b) un componente liofilizado que incluye uno o más antígenos. Una composición de vacuna adecuada para la administración al paciente se obtiene mezclando los componentes (a) y (b). En algunas realizaciones, el componente (a) está exento de antígenos, de modo que todos los componentes antigénicos en la vacuna final proceden del componente (b); en otras realizaciones, el componente (a) incluye uno o más antígenos, de modo que los componentes antigénicos en la vacuna final proceden de los componentes tanto (a) como (b).

Otro formato líquido/liofilizado útil comprende (a) un complejo acuoso de la sal de aluminio y un agonista de TLR7 y (b) un componente liofilizado que incluye uno o más antígenos. Una composición de vacuna adecuada para la administración del paciente se obtiene mezclando los componentes (a) y (b). En algunas realizaciones, el componente (a) está exento de antígenos, de modo que todos los componentes antigénicos en la vacuna final proceden del componente (b); en otras realizaciones, el componente (a) incluye uno o más antígenos, de modo que los componentes antigénicos en la vacuna final proceden de los componentes tanto (a) como (b).

Por lo tanto, un kit para preparar una vacuna de combinación, puede comprender componentes (a) y (b) como se ha indicado antes. Los componentes del kit son típicamente viales o jeringas, y un solo kit puede contener tanto un vial como una jeringa. La invención también proporciona un procedimiento para preparar dicho kit, que comprende las siguientes etapas: (i) preparar una vacuna de componente acuoso como se ha descrito antes; (ii) envasar dicha vacuna de combinación acuosa en un primer recipiente, p. ej., una jeringa; (iii) preparar un componente que contiene antígeno en forma liofilizada; (iv) envasar dicho antígeno liofilizado en un segundo recipiente, p. ej., un vial; y (v) envasar el primer recipiente y el segundo recipiente juntos en un kit. Después el kit se puede distribuir a los médicos.

Un formato líquido/liofilizado es particularmente útil para vacunas que incluyen un componente conjugado, en particular conjugados de Hib y/o meningocócicos y/o neumocócicos, ya que estos pueden ser más estables en forma liofilizada. Por lo tanto, los conjugados se pueden liofilizar antes de su uso con la invención.

Cuando un componente se liofiliza, en general incluye componentes no activos que se añadieron antes de la liofilización, p. ej., como estabilizantes. Los estabilizantes preferidos para la inclusión son lactosa, sacarosa y manitol, así como mezclas de los mismos, p. ej. mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol, etc. Por lo tanto, una vacuna final obtenida por reconstitución acuosa del material liofilizado puede contener lactosa y/o sacarosa. Se prefiere usar excipientes amorfos y/o tampones amorfos cuando se preparan vacunas liofilizadas [123].

Las composiciones preferidas de la invención incluyen (1) toxoides diftérico, tetánico y pertussis, poliovirus inactivado para los tipos 1, 2 y 3, más (2) antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y/o un conjugado de Hib. Estas composiciones pueden consistir en los antígenos especificados, o pueden incluir además antígenos de patógenos adicionales (p. ej., meningococos). Por lo tanto, las composiciones se pueden usar como vacunas por sí mismas o como componentes de otras vacunas.

Cuando una composición incluye tanto toxoides diftéricos como tetánicos, estos pueden estar presentes en diferentes proporciones. Preferiblemente hay un exceso de toxoide diftérico (medido en unidades Lf), p. ej., entre 2-4x más toxoide diftérico que toxoide tetánico, tal como 2,5x o 3x más.

Métodos de tratamiento y administración de la vacuna

Las composiciones de la invención son adecuadas para la administración a pacientes humanos, y se proporciona un método para producir una respuesta inmunitaria en un paciente, que comprende la etapa de administrar una composición de la invención al paciente.

Una composición de la invención puede ser para usar en medicina.

También se proporciona el uso de (i) al menos un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis y (ii) un adyuvante de sal de aluminio, en la fabricación de una vacuna de combinación que incluye menos de 0,2 mg de Al^{+++} por dosis unitaria.

También se proporciona el uso de (i) al menos un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis y (ii) un adyuvante de sal de aluminio, en la fabricación de una vacuna de combinación que incluye una dosis baja de cada uno de un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis.

También proporciona el uso de (i) al menos un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis, y (ii) un adyuvante de sal de aluminio, en la fabricación de una vacuna de combinación que incluye una dosis baja de cada uno de un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis y tiene menos de 0,2 mg de Al^{+++} por dosis

unitaria.

Se describe en la presente memoria el uso de (i) un toxoide diftérico, un toxoide tetánico, un toxoide pertussis y un conjugado de Hib, (ii) un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y/o un antígeno de poliovirus inactivado, y (iii) un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en la fabricación de una vacuna de combinación.

Las composiciones inmunógenas de la invención son preferiblemente vacunas, para usar en la prevención de al menos la difteria, tétanos y tos ferina. Dependiendo de su contenido de antígeno, las vacunas también pueden proteger contra la meningitis bacteriana, polio, hepatitis, etc.

Con el fin de tener una eficacia completa, un programa de inmunización primario típico (en particular para un niño) puede implicar la administración de más de una dosis. Por ejemplo, las dosis pueden ser a los 0 y 6 meses (siendo el tiempo 0 la primera dosis); a los 0, 1, 2 y 6 meses; el día 0, día 21 y después una tercera dosis entre los 6 y 12 meses; a los 2, 4 y 6 meses; a los 3, 4 y 5 meses; a las 6, 10 y 14 semanas; a los 2, 3 y 4 meses; o a los 0, 1, 2, 6 y 12 meses.

Las composiciones también se pueden usar como dosis de refuerzo, p. ej., para niños, en el segundo año de vida.

Las composiciones de la invención se pueden administrar por inyección intramuscular, p. ej., en el brazo o la pierna.

Programa de inmunización infantil con menos dosis

También se proporciona un programa de inmunización para un bebé (es decir, un niño entre el nacimiento y 1 año de edad) en el que solo se administran una o dos composiciones que contienen DTP. Por lo tanto, también se describe el uso de menos dosis en comparación con el programa normal actual de 3 dosis, pero sin pérdida de efecto inmunoprotector.

También se describe en la presente memoria:

- un método para inmunizar a un bebé contra al menos la difteria, tétanos y tos ferina (tos convulsiva), que comprende administrar al bebé no más de dos dosis de una vacuna de combinación que comprende un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide *pertussis*.

- un método para inmunizar a un bebé contra al menos la difteria, tétanos y tos ferina (tos convulsiva), que comprende administrar al bebé no más de dos dosis de una vacuna de combinación que comprende un toxoide diftérico, un toxoide tetánico, un toxoide pertussis y adyuvante de sal de aluminio, en donde cada dosis de la vacuna contiene menos de 0,2 mg de Al^{+++}.

- un método para inmunizar a un bebé contra al menos la difteria, tétanos y tos ferina (tos convulsiva), que comprende administrar al bebé no más de dos dosis de una vacuna de combinación que comprende un adyuvante de sal de aluminio y una dosis baja de cada uno de un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis.

- un método para inmunizar a un bebé contra al menos la difteria, tétanos y tos ferina (tos convulsiva), que comprende administrar al bebé no más de dos dosis de una vacuna de combinación que comprende (i) una dosis baja de cada uno de un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis, y (ii) un adyuvante de sal de aluminio; en donde cada dosis de la vacuna contiene menos de 0,2 mg de Al^{+++}.

- un método para inmunizar a un bebé contra al menos la difteria, tétanos y tos ferina (tos convulsiva), que comprende administrar al bebé no más de dos dosis de una vacuna de combinación exenta de aluminio que comprende un toxoide diftérico, un toxoide tetánico, un toxoide pertussis y un adyuvante de emulsión de aceite en agua. La vacuna puede tener una dosis baja de cada uno de un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis.

- uso de al menos un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis en la fabricación de una vacuna de combinación para inmunizar a un bebé contra al menos la difteria, tétanos y tos ferina, en donde la vacuna se prepara para administrar al bebé no más de dos dosis. La vacuna puede: (i) incluir un adyuvante de sal de aluminio, en cuyo caso puede incluir menos de 0,2 mg de Al^{+++} por dosis unitaria; y/o (ii) tener una dosis baja de cada uno de un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis.

- uso de al menos un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis en la fabricación de una vacuna de combinación exenta de aluminio para inmunizar a un bebé contra al menos la difteria, tétanos y tos ferina, en donde la vacuna se prepara para la administración al bebé en no más de dos dosis. La vacuna puede comprender, ya sea durante la fabricación o en el punto de uso, un adyuvante de emulsión de aceite en agua. La vacuna puede tener una dosis baja de cada uno de un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis.

- una vacuna de combinación que comprende al menos un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis, para usar en un método para inmunizar a un bebé contra al menos la difteria, tétanos y tos ferina (tos convulsiva) administrando al bebé no más de dos dosis de la vacuna de combinación. La vacuna puede: (i) incluir un adyuvante de sal de aluminio, en cuyo caso puede incluir menos de 0,2 mg de Al^{+++} por dosis unitaria; y/o (ii) tener

una dosis baja de cada uno de un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis.

- una vacuna de combinación exenta de aluminio que comprende al menos un adyuvante de emulsión de aceite en agua, un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis, para usar en un método para inmunizar a un bebé contra al menos la difteria, tétanos y tos ferina (tos convulsiva) administrando al bebé no más de dos dosis de la vacuna de combinación. La vacuna puede tener una dosis baja de cada uno de un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis.

La vacuna de combinación incluye un toxoide pertussis. Este se puede incorporar en la vacuna como una proteína dentro de un antígeno de pertussis celular, pero se prefiere usar un antígeno de pertussis acelular, como se ha descrito con más detalle antes.

En los programas de inmunización descritos en la presente memoria, no se administran más de dos dosis de la vacuna al bebé, es decir, el bebé recibe una sola dosis o dos dosis de la vacuna, pero no recibe tres (o más) dosis. Sin embargo, el bebé puede recibir una tercera (y quizás más) dosis más tarde en su vida, es decir, después de su primer cumpleaños o después de su segundo cumpleaños.

La una o dos dosis se dan preferiblemente al bebé (i) entre 1 y 5 meses de edad, (ii) entre 2 y 4 meses de edad, (iii) entre 3 y 5 meses de edad, (iv) entre 6 y 16 semanas de edad, o (v) entre 0 y 3 meses de edad. Por ejemplo, se pueden administrar dos dosis a los (i) 1 y 2 meses de edad, (ii) 2 y 4 meses de edad, (iii) 3 y 4 meses de edad, (iv) 2 y 3 meses de edad, (v) 0 y 1 mes de edad, etc.

General

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", p. ej., una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, p. ej., X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", p. ej., una composición que está "sustancialmente exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico *x* significa, p. ej., *x* ± 10%.

Salvo que se indique específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezclamiento. Por lo tanto, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, entonces se pueden combinar entre sí dos componentes, y después la combinación se puede combinar con el tercer componente, etc.

Cuando un antígeno se describe como que está "adsorbido" a un adyuvante, se prefiere que al menos 50% (en peso) de ese antígeno esté adsorbido, p. ej., 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o más. Se prefiere que tanto el toxoide diftérico como el toxoide tetánico estén totalmente adsorbidos, es decir, ninguno es detectable en el líquido sobrenadante. Se puede usar la adsorción total de HBsAg.

Las cantidades de conjugados en general se dan en términos de masa de sacárido (es decir, la dosis del conjugado (transportador + sacárido) como un todo es mayor que la dosis indicada) con el fin de evitar la variación debido a la elección del transportador.

Cuando una composición incluye un adyuvante de sal de aluminio, entonces preferiblemente no incluye también un adyuvante de emulsión de aceite en agua. A la inversa, cuando una composición incluye un adyuvante de emulsión de aceite en agua, entonces preferiblemente no incluye también un adyuvante de sal de aluminio.

Los grupos que contienen fósforo usados con la invención pueden existir en una serie de formas protonadas y desprotonadas dependiendo del pH del entorno circundante, por ejemplo, el pH del disolvente en el que se disuelven. Por lo tanto, aunque se puede ilustrar aquí una forma particular en la presente memoria, se pretende que salvo que se mencione lo contrario, estas ilustraciones sean meramente representativas y no limitantes a una forma protonada o desprotonada específica. Por ejemplo, en el caso de un grupo fosfato, esto se ha ilustrado como $-OP(O)(OH)_2$, pero la definición incluye las formas protonadas $-[OP(O)(OH_2)(OH)]^+$ y $-[OP(O)(OH_2)_2]^{2+}$ que pueden existir en condiciones ácidas y las formas desprotonadas $-[OP(O)(OH)(O)]^-$ y $[OP(O)(O)_2]^{2-}$ que pueden existir en condiciones básicas. La invención abarca todas dichas formas.

Los agonistas de TLR pueden existir como sales farmacéuticamente aceptables. Por lo tanto, los compuestos se pueden usar en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, es decir, sal fisiológica o toxicológicamente tolerable (que incluye, cuando sea adecuado, sales de adición de base farmacéuticamente aceptables y sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables).

En el caso de los agonistas de TLR mostrados en la presente memoria que pueden existir en formas tautómeras (es decir, en formas ceto o enol), el compuesto se puede usar en todas las formas tautómeras.

Cuando se administra un compuesto al cuerpo como parte de una composición, entonces ese compuesto puede

reemplazarse alternativamente por un profármaco adecuado.

Cuando se usan materiales animales (y en particular bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse de fuentes que estén exentas de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) y, en particular, exentas de encefalopatía espongiforme bovina (EEB).

Breve descripción de los dibujos

No hay dibujos

Modos de llevar a cabo la invención

Adsorción de antígenos a adyuvante

Las vacunas 3-valentes (DTaP) o 6-valentes (DTaP-HBsAg-PVI-Hib) se adyuvaron con hidróxido de aluminio solo, hidróxido de aluminio con "compuesto T" preadsorbido, micropartículas de poli(lactida-co-glicólido) ("PLG") y emulsión de aceite en agua MF59. El hidróxido de aluminio y el hidróxido de aluminio con "compuesto T" preadsorbido se prepararon en tampón de histidina a pH 6,5. A pH 6,5, el hidróxido de aluminio tiene una carga neta positiva, mientras que la mayoría de las proteínas tienen una carga neta negativa. El valor de pH se eligió para proporcionar una buena adsorción de la mayoría de los antígenos ensayados. Todas las formulaciones con adyuvante de hidróxido de aluminio o hidróxido de aluminio con "compuesto T" preadsorbido mostraron valores óptimos de pH (6,5-6,8 ± 0,1) y osmolaridad (0,300 ± 50 mO). La osmolaridad se ajustó con NaCl. Los antígenos para las formulaciones con adyuvante MF59 se prepararon en PBS. Las preparaciones resultantes tenían valores de pH entre 6,2 y 7,3 y valores de osmolaridad de aproximadamente 0,300 ± 50 mO. Las formulaciones que contenían micropartículas de PLG se prepararon en agua. Las formulaciones de PLG mostraron valores de osmolaridad subóptimos. El pH de las formulaciones de PLG variaba de 5,8 a 6,5 + 0,1. Las micropartículas de PLG se prepararon con dioctilsulfosuccinato (DSS) que confiere una carga neta negativa a las micropartículas. Por lo tanto, la interacción de las micropartículas con el antígeno es mediada por cargas positivas sobre la superficie del antígeno.

Para el hidróxido de aluminio solo, el hidróxido de aluminio con "compuesto T" preadsorbido y PLG, la adsorción se detectó separando los complejos de adyuvante-antígeno de los antígenos no adsorbidos por centrifugación. Se añadió DOC al 0,4% al líquido sobrenadante que contenía los antígenos no adsorbidos. Los antígenos se precipitaron por la adición de 60% de TCA y se recogieron por centrifugación. El sedimento que contenía los antígenos precipitados con TCA se volvió a suspender en tampón de carga y se cargó en un gel de SDS-PAGE. El sedimento que contenía los complejos de adyuvante-antígeno se volvió a suspender en un tampón de desorción (concentración 4X: Na_2HPO_4 0,5 M pH, 8 g de SDS, 25 g de glicerol, 6,16 g de DTT y azul de bromofenol), el hidróxido de aluminio se separó por centrifugación y el líquido sobrenadante se aplicó a un gel de SDS-PAGE. La emulsión de aceite en agua MF59 que contenía antígenos se separó por centrifugación en una fase oleosa y una fase acuosa. Tanto la fase acuosa que contenía antígenos no absorbidos como la fase oleosa que supuestamente contenía antígenos asociados a MF59 se mezclaron con tampón de carga y se aplicaron a un gel de SDS-PAGE. Después de la separación electroforética de las muestras, los geles se analizaron por tinción con azul de Coomassie o por transferencia Western.

Usando hidróxido de aluminio solo en una concentración de 2 mg/ml, los perfiles de adsorción para TD, TT, TP, HAF y 69K detectados por tinción con azul Coomassie se completaron tanto para la formulación 3-valente como para la formulación 6-valente. No se detectaron bandas en los líquidos sobrenadantes tratados con DOC-TCA. El análisis de transferencia Western confirmó la adsorción completa en hidróxido de aluminio para TD, TT, TP, HAF y 69K tanto para la formulación 3-valente como para la formulación 6-valente. Del mismo modo, los otros cinco antígenos, PVI1, PVI2, PVI3, HBsAg y Hib-CRM, no mostraron ninguna banda detectable en los líquidos sobrenadantes tratados con DOC-TCA de las formulaciones adsorbidas en hidróxido de aluminio. Por lo tanto, los diez antígenos presentes en la formulación 6-valente se adsorben completamente en hidróxido de aluminio.

Para el hidróxido de aluminio con "compuesto T" preadsorbido, la adsorción del antígeno difería entre la formulación 3-valente y la formulación 6-valente. Se ensayaron cuatro concentraciones diferentes de "compuesto T" (0,1, 0,025, 0,01, 0,005 mg/ml). La concentración de hidróxido de aluminio se mantuvo constante en 2 mg/ml. Con 0,1 mg/ml de "compuesto T", todos los antígenos en la formulación 3-valente se adsorbieron por completo. En cambio, 69K y PT en la formulación 6-valente no se adsorbieron completamente como se determina por tinción con azul Coomassie. Con 0,01 mg/ml de "compuesto T", el análisis de transferencia Western confirmó la adsorción de los diez antígenos en la formulación 6-valente. Solo una pequeña cantidad de TT era todavía detectable en el líquido sobrenadante usando transferencia Western. El hecho de que TT pudiera detectarse en el líquido sobrenadante por transferencia Western pero no por SDS-PAGE probablemente se debe a la mayor sensibilidad del primer método. Por lo tanto, a concentraciones más altas, el "compuesto T" parece competir con los antígenos por la unión al adyuvante. Esto podría explicar por qué el efecto solo se vuelve evidente en presencia de un mayor número de antígenos, es decir, cuando está disponible menos hidróxido de aluminio por antígeno.

Usando micropartículas de PLG, el TD, TT, PVI1, PVI2, PVI3, HAF y CRM del conjugado Hib-CRM estaban presentes principalmente en los líquidos sobrenadantes detectándose solo pequeñas cantidades de TD, PVI1, PVI2

y HAF por transferencia Western en el sedimento que contiene los complejos de antígeno-adyuvante. 69K y TP parecían estar presentes en cantidades similares en líquido sobrenadante y el sedimento. El HBsAg no se podía detectar ni en el líquido sobrenadante ni en el sedimento de las formulaciones de PLG. En comparación con las preparaciones que contienen hidróxido de aluminio o hidróxido de aluminio con el "compuesto T" preadsorbido, el PLG absorbía significativamente menos antígeno. Además, los perfiles de adsorción de antígenos usando PLG mostraban una tendencia opuesta a la vista en presencia de los otros dos adyuvantes, reflejando probablemente la carga neta negativa de PLG frente a la carga neta positiva del hidróxido de aluminio o hidróxido de aluminio con "compuesto T" preadsorbido.

MF59 es un sistema de suministro considerado en general incapaz de interaccionar físicamente con los antígenos como se muestra por la ausencia de una deposición de antígeno en el sitio de inyección y la eliminación independiente de MF59 y los antígenos (véanse las referencias 124 y 125). Se ensayaron las relaciones 1:1, 1:3 y 1:10 (v:v de MF59 para completar la formulación de antígeno). Para las tres relaciones ensayadas, el análisis de SDS-PAGE y transferencia Western mostró que los diez antígenos ensayados estaban presentes en la fase acuosa de las formulaciones con adyuvante MF59. Por lo tanto, los perfiles de antígenos de las formulaciones con adyuvante MF59 se correspondían con los perfiles de las formulaciones sin adyuvantes. Los resultados confirmaron que MF59 no interacciona con ninguno de los antígenos ensayados.

Sustitución o reducción de los adyuvantes de sales de aluminio

El producto INFANRIX HEXA de GlaxoSmithKline contiene ≥30 UI de toxoide diftérico, ≥40 UI de toxoide tetánico, un componente de pertussis acelular (25/25/8 µg de TP/HAF/pertactina), 10 µg de HBsAg, un componente de PVI trivalente (40/8/32 UD de tipos 1/2/3) y 10 µg de conjugado de Hib. La vacuna se presenta como una vacuna acuosa 5-valente que se usa para reconstituir el conjugado de Hib de su forma liofilizada, para dar una dosis unitaria acuosa de 0,5 ml para bebés humanos que contiene 0,95 mg de hidróxido de aluminio y 1,45 mg de fosfato de aluminio.

Para investigar adyuvantes alternativos (véase antes), se preparó con adyuvante una mezcla 6-valente con hidróxido de aluminio solo (2 mg/ml en tampón de histidina), con hidróxido de aluminio con "compuesto T" preadsorbido (véase antes; 1 mg/ml), con micropartículas de poli(láctida-co-glicólido) ("PLG", usado en 40 mg/ml), o con la emulsión de aceite en agua MF59 (mezclada en igual volumen con antígenos en solución salina tamponada con fosfato). Se usaron los mismos diluyentes en todos los experimentos con ratones descritos a continuación. La osmolaridad de las formulaciones se ajustó con NaCl cuando era necesario. También se preparó un control sin adyuvante. Las concentraciones de antígeno eran las siguientes (por ml):

TD	TT	PT	HAF	Pertactina
36,9 Lf	14,8 Lf	36,9 µg	36,9 µg	11,8 µg
PVI Tipo 1	PVI tipo 2	PVI tipo 3	HBsAg	Hib
59,1 UD	11,8 UD	47,3 UD	14,8 µg	14,8 µg

También se usaron los mismos adyuvantes con una mezcla de D-T-Pa 3-valente (mismas concentraciones).

La osmolaridad y el pH se midieron (y, si era necesario, se ajustaron) después de combinar los componentes con el fin de asegurar la aceptabilidad fisiológica. Para todas las composiciones 3-valentes, el pH estaba entre 5,9 y 7,1 y la osmolaridad estaba entre 290-320 mOsm/kg (excepto uno a >400 mOsm/kg). Para todas las composiciones 6-valentes, el pH estaba entre 5,5 y 6,8 y la osmolaridad estaba entre 260-320 mOsm/kg (excepto uno a >500 mOsm/kg). Un control de tampón tenía un pH de 7,3 y 276 mOsm/kg.

La integridad e inmunogenicidad de los antígenos combinados también se ensayaron. Ninguno de los antígenos mostró un perfil analítico alterado después de haber sido formulado como combinaciones, es decir, los antígenos y los adyuvantes son físicamente compatibles entre sí.

Con hidróxido de aluminio solo, todos los antígenos se adsorbieron bien al adyuvante. Con hidróxido de aluminio y compuesto "T" (es decir, hidróxido de aluminio que se había mezclado previamente con "compuesto T" para permitir la adsorción para la formación de un complejo adyuvante estable; "Al-T" en lo sucesivo) todos los antígenos se adsorbieron bien, excepto que TT, pertactina y TP se desorbieron parcialmente.

Con el adyuvante PLG, los toxoides diftérico y tetánico no se adsorbieron, pero se adsorbió el toxoide pertussis.

Se inmunizaron ratones (Balb/c hembra, 4 semanas de edad) por vía intramuscular con 100 µl de cada composición (es decir, 1/5 del volumen de dosis humana) los días 0 y 28. Los sueros se recogieron 14 días después de cada inyección. Después de la segunda inmunización, los títulos de anticuerpos IgG eran los siguientes:

	Sin adyuvante	Hidróxido de Al	MF59	PLG	Al-T	Infanrix-6
Vacunas 3-valentes						
TD	750	21626	15693	9430	23395	-
TT	13120	17868	22458	15917	23131	-
Pertactina	639	7209	10258	3946	12857	-
TP	2501	8270	7212	3679	9938	-
HAF	3982	12057	14098	14139	23008	-
Vacunas 6-valentes						
TD	1751	18914	13982	7658	23102	21581
TT	12729	16756	22229	13744	23267	15998
Pertactina	333	6299	9363	2912	5153	10809
PT	3069	3384	4823	3906	6484	6052
HAF	4558	7206	16201	15206	19383	11051
Hib	177	813	1266	654	2153	1269
HBsAg	1058	1598	2288	1053	4501	1113

Por lo tanto, para todos estos antígenos, la inclusión de un adyuvante aumentaba los títulos de anticuerpos IgG. Los mejores títulos se vieron usando Al-T. Los siguientes mejores eran con MF59, que daba mejores resultados que el hidróxido de aluminio solo. Los títulos obtenidos usando Al-T eran mejores para todos los antígenos que los observados con Infanrix Hexa, excepto para la pertactina.

Además, los datos muestran que los buenos resultados logrados con la vacuna 3-valente se mantienen incluso después de añadir PVI, Hib y HBsAg.

Las respuestas de IgG también se investigaron por subclase. Para la mayoría de los antígenos en las vacunas 6-valentes, los adyuvantes tenían poco efecto en los títulos de IgG1, pero aumentaban los títulos de IgG2a e IgG2b. Los mejores títulos de IgG2a e IgG2b se obtuvieron con Al-T y después con MF59.

Los títulos mayores observados con Al-T en comparación con el hidróxido de aluminio solo, o con la mezcla de sales de aluminio observada en Infanrix Hexa, significa que la cantidad total de aluminio por dosis se puede reducir mientras se mantiene la potenciación de la respuesta inmunitaria.

Reducción de dosis de antígeno

Los experimentos se diseñaron para investigar si los adyuvantes mejorados se podrían usar para reducir la cantidad de antígeno por dosis. Se hicieron diluciones de 10 veces, 50 veces y 100 veces (con respecto a la dosis humana es decir, para administrar 1 µg, 0,2 µg o 0,1 µg de HBsAg a cada ratón por dosis de 100 µl) de las combinaciones de antígenos 6-valentes mientras se mantenían las concentraciones de adyuvante.

Se midieron la osmolaridad y el pH (y, si era necesario, se ajustaron) después de dilución. Para todas las composiciones 6-valentes, el pH estaba entre 6,1 y 7,0 y la osmolaridad estaba entre 275-320 mOsm/kg. Un control de tampón tenía un pH de 7,3 y 285 mOsm/kg.

Los ratones se inmunizaron de la misma manera que se ha descrito antes. Los títulos totales de IgG sérica después de 2 inmunizaciones eran los siguientes:

	Sin adyuvante			Hidróxido de Al			MF59			Al-T		
	1/10	1/50	1/100	1/10	1/50	1/100	1/10	1/50	1/100	1/10	1/50	1/100
TD	459	2043	137	18357	13106	7541	17431	6003	8736	21913	16807	13724
TT	7602	7929	1700	17595	9664	5531	22791	12062	13015	23570	12237	13183

Pertactina	827	2154	341	10880	8135	4181	17159	10591	7288	17098	10748	8952
TP	3612	5645	2129	5287	3266	1068	7200	3659	5493	9051	4203	2717
HAF	2305	4161	101	8997	4471	1442	19197	5179	4492	22151	8293	3252
Hib	171	352	109	1380	796	251	3147	573	2415	3056	1440	1815
HBsAg	525	412	129	1034	685	226	4885	1103	1983	5270	1526	950

Por lo tanto, la presencia de adyuvantes permitía una reducción de la dosis de 5 veces o 10 veces mientras se mantenían títulos de IgG que son comparables o superiores a los antígenos sin adyuvantes. MF59 y Al-T en particular son útiles para ahorrar dosis de antígenos de esta manera.

Dosis de adyuvante

Con la dilución de antígeno de 100 veces, también se redujo la cantidad de adyuvante. La emulsión MF59 se mezcló con antígenos en una relación 1:1 en volumen o en una proporción 1:3 (es decir, 1 ml de emulsión por cada 3 ml de antígeno, con 2 ml de tampón para mantener el volumen total) o en una proporción 1:10. El complejo de Al-T se preparó en 3 concentraciones que tenían 2 mg/ml de hidróxido de aluminio con 5 µg, 25 µg o 100 µg de "compuesto T" por dosis. Para comparación, se ensayó una dosis de antígeno 1:100 en forma sin adyuvante o con hidróxido de aluminio solo. También se usó una dilución 1:100 de Infanrix Hexa para comparación.

Se midieron la osmolaridad y el pH n (y, si era necesario, se ajustaron) después de la mezcla (excepto para Infanrix Hexa). Para las composiciones 6-valentes, el pH estaba entre 6,2 y 7,3 y la osmolaridad estaba entre 270-320 mOsm/kg. Un control de tampón tenía pH 7,3 y 280 mOsm/kg.

Los ratones se inmunizaron como antes. Los títulos totales de IgG sérica después de 2 inmunizaciones eran los siguientes:

	Sin adyuvante	Infanrx Hexa	Hidróxido de Al	MF59 (v:v)			Al-T (µg "T")		
				1:1	1:3	1:10	100	25	5
TD	584	6282	10849	7786	4094	8442	21571	20865	11788
TT	3426	5415	6857	11506	9197	11422	16041	15124	6236
Pertactina	48	3017	6053	8838	2970	2876	6158	6697	3815
TP	3351	1751	2699	4406	5072	6020	2476	2696	3079
HAF	262	7886	5626	14700	11340	10205	7369	8634	6120
Hib	126	109	310	518	517	550	936	792	390
HBsAg	88	240	369	2645	1784	1670	4062	2308	1154

Por lo tanto, cantidades menores de MF59 y Al-T todavía retienen una buena función adyuvante y pueden inducir títulos mayores de anticuerpos IgG que los inducidos por formulaciones de antígeno 6-valentes sin adyuvante. Al reducir la cantidad de adyuvante, a la vez que se mantiene la eficacia inmunológica, se puede mejorar el perfil de seguridad de una vacuna, lo que es particularmente importante en entornos pediátricos.

Se entenderá que la invención se ha descrito solo a modo de ejemplo y se pueden hacer modificaciones mientras estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Tabla A: Contenido de antígeno y Al^{+++} de diferentes vacunas comercializadas (por dosis unitaria)

	D	T	Pa(1)	Hib(2)	PVI(3)	HBsAg	Vol	Al^{+++}
Pediacel	15 Lf	5Lf	20/20/3	10	40/8/32	-	0,5 ml	0,33 mg
Pediarix	25 Lf	10 Lf	25/25/8	-	40/8/32	10 µg	0,5 ml	≤0,85 mg
Pentacel	15 Lf	5 Lf	20/20/3	10	40/8/32	-	0,5 ml	0,33 mg

Tritanx HB	≥30 UI	≥60 UI	-(4)	-	-	10 µg	0,5 ml	0,63 mg
Quinvaxem	≥30 UI	≥60 UI	-(4)	10	-	10 µg	0,5 ml	0,3 mg
Hexavac	30 Lf	10 Lf	25/25/-	12	40/8/32	5 µg	0,5 ml	0,3 mg
Boostrix	2,5 Lf	5 Lf	8/8/2,5	-	-	-	0,5 ml	≤0,39 mg
Adacel	5 Lf	2 Lf	2,5/5/3	-	-	-	0,5 ml	0,33 mg
Daptacel	15 Lf	5 Lf	10/5/3	-	-	-	0,5 ml	0,33 mg
Pentavac	≥30 UI	≥40 UI	25/25/-	10	40/8/32	-	0,5 ml	0,30 mg
SII QVac	20-30 Lf	5-25 Lf	-(4)	-	-	≥10 µg	0,5 ml	≤1,25 mg
TripVacHB	≥30 UI	≥60 UI	-(4)	-	-	10 µg	0,5 ml	≤1,25 mg

Notas:

(1) La dosis de Pa muestra cantidades de toxoide pertussis, después HAF, después pertactina (µg). Los componentes de Pa de Pediacel, Daptacel y Adacel también contienen fimbrias de tipos 2 y 3.

(2) La dosis de Hib muestra la cantidad de sacárido capsular PRP (µg).

(3) La dosis de PVI muestra cantidades de tipo 1, después de tipo 2 y después de tipo 3 (medido en UD).

(4) Tritanrix-HepB, Quinvaxem, TripVac HB y SII Q-Vac incluyen antígenos de pertusis de células enteras.

Referencias

[1] Vaccines. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.

[2] François et al. (2005) Pediatr Infect Dis J 24:953-61.

[3] Baylor et al. (2001) Vaccine 20 (Supplement 3):S18-S23

[4] Tamm et al. (2005) Vaccine 23:1715-19.

[5] WO2008/028956.

[6] National Institute for Biological Standards and Control; Potters Bar, UK. www.nibsc.ac.uk

[7] Sesardic et al. (2001) Biologicals 29:107-22.

[8] NIBSC code: 98/560.

[9] Module 1 of WHO's The immunological basis for immunization series (Galazka).

[10] NIBSC code: 69/017.

[11] NIBSC code: DIFT.

[12] Sesardic et al. (2002) Biologicals 30:49-68.

[13] NIBSC code: 98/552.

[14] NIBSC code: TEFT.

[15] Rappuoli et al. (1991) TIBTECH 9:232-238.

[16] Nencioni et al. (1991) Infect Immun. 59(2): 625-30.

[17] Ramsay et al. (2001) Lancet 357(9251):195-196.

[18] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36.

[19] Buttery & Moxon (2000) JR Coll Physicians Lond 34:163-168.

[20] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii.

[21] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567.

[22] European patent 0477508.

[23] US patent 5,306,492.

[24] WO98/42721.

[25] Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, particularly vol. 10:48-114.

[26] Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 or 012342335X.

[27] WO96/40242.

[28] Vanlandschoot et al. (2005) J Gen Virol 86:323-31.

[29] WO2007/054820.

[30] WO03/066094.

[31] Liao et al. (2012) J Infect Dis. 205:237-43.

[32] Verdijk et al. (2011) Expert Rev Vaccines. 10:635-44.

[33] Module 6 of WHO's The immunological basis for immunization series (Robertson)

[34] W.H.O. Tech. Rep. Ser. 594:51, 1976.

[35] WO03/080678.

[36] Glode et al. (1979) J Infect Dis 139:52-56

[37] WO94/05325; US patent 5,425,946.

[38] Arakere & Frasch (1991) Infect. Immun. 59:4349-4356.

[39] Michon et al. (2000) Dev. Biol. 103:151-160.

[40] Rubinstein & Stein (1998) J. Immunol. 141:4357-4362.

[41] WO2005/033148

[42] WO2005/000347.

[43] WO02/058737.

[44] WO03/007985.

[45] WO2007/000314.

[46] WO2007/000322.

[47] Giuliani et al. (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103(29):10834-9.

[48] WO99/57280.

[49] Masignani et al. (2003) J Exp Med 197:789-799.

[50] Welsch et al. (2004) J Immunol 172:5605-15.

[51] Hou et al. (2005) J Infect Dis 192(4):580-90.

[52] WO03/063766.

[53] Fletcher et al. (2004) Infect Immun 72:2088-2100.

[54] Zhu et al. (2005) Infect Immun 73(10):6838-45.

[55] WO2004/048404

[56] Serruto et al. (2010) PNAS USA 107:3770-5.

[57] Tettelin et al. (2000) Science 287:1809-15.

[58] WHO Technical Report Series No. 927, 2005. Pages 64-98.

[59] US-2008/0102498.

[60] US-2006/0228381.

[61] US-2007/0231340.

[62] US-2007/0184072.

[63] US-2006/0228380.

[64] WO2008/143709.

[65] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)

[66] EP-A-0378881.

[67] EP-A-0427347.

[68] WO93/17712

[69] WO94/03208.

[70] WO98/58668.

[71] EP-A-0471177.

[72] WO91/01146

[73] Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.

[74] Baraldo et al. (2004) Infect Immun 72(8):4884-7.

[75] EP-A-0594610.

[76] Ruan et al. (1990) J Immunol 145:3379-3384.

[77] WO00/56360.

[78] Kuo et al. (1995) Infect Immun 63:2706-13.

[79] Michon et al. (1998) Vaccine. 16:1732-41.

[80] WO02/091998.

[81] WO01/72337

[82] WO00/61761.

[83] WO00/33882

[84] WO2007/071707

[85] Bethell G.S. et al., J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-4

[86] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18

[87] WO2007/000343.

[88] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919

[89] EP-A-0208375

[90] WO00/10599

[91] Gever et al., Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).

[92] Patente US 4,057,685.

[93] Patentes US 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.

[94] Patente US 4,459,286.

[95] Patente US 5,204,098

[96] Patente US 4,965,338

[97] Patente US 4,663,160.

[98] US-2007/0184071.

[99] Jodar et al. (2003) Vaccine 21:3265-72.

[100] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).

[101] Clausi et al. (2008) J Pharm Sci DOI 10.1002/jps.21390.

[102] Solicitud Internacional PCT/US2011/050231.

[103] Solicitud de patente US61/316,551.

[104] Solicitud de patente US61/379,126.

[105] WO2011/027222.

[106] WO2011/024072.

[107] WO2010/144734.

[108] WO90/14837.

[109] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.

[110] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.

[111] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.

[112] WO2008/043774.

[113] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.

[114] Hariharan et al. (1995) Cancer Res 55:3486-9.

[115] US-2007/014805.

[116] WO2007/080308.

[117] WO95/11700.

[118] Patente US 6,080,725.

[119] WO2005/097181.

[120] WO2006/113373.

[121] US-6630161.

[122] Nony et al. (2001) Vaccine 27:3645-51.

[123] WO01/41800.

[124] Dupuis et al. (1999) Vaccine 18:434-9.

[125] Immunopotentiators in Modern Vaccines (2006) Schijns and O'Hagan (eds.) ISBN: 0-12-088403-8.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena en forma de dosis unitaria para administrar a un paciente, que comprende (i) un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un antígeno de pertussis acelular que contiene un toxoide pertussis, (ii) un adyuvante de sal de aluminio, en donde la cantidad de Al^{+++} en la dosis unitaria es de 10 µg a menos de 0,2 mg, y (iii) un agonista de TLR7 adsorbido al adyuvante de sal de aluminio, en donde el agonista de TLR7 incluye al menos un grupo fosfato o fosfonato y en donde el adyuvante de sal de aluminio y el agonista de TLR7 forman un complejo adyuvante estable que retiene la capacidad del adyuvante de sal de aluminio de adsorber antígenos.

2. Una composición inmunógena que comprende (i) un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un toxoide pertussis, (ii) un adyuvante de sal de aluminio, en donde la cantidad de Al^{+++} es de 20 µg/ml a menos de 0,4 mg/ml, y (iii) un agonista de TLR7 adsorbido al adyuvante de sal de aluminio, en donde el agonista de TLR7 incluye al menos un grupo fosfato o fosfonato y en donde el adyuvante de sal de aluminio y el agonista de TLR7 forman un complejo adyuvante estable que retiene la capacidad del adyuvante de sal de aluminio de adsorber antígenos.

3. La composición de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde la composición incluye uno o más de (i) un conjugado de Hib, (ii) un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y/o (iii) un antígeno de poliovirus inactivado.

4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la sal de aluminio es hidróxido de aluminio o hidroxifosfato de aluminio.

5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la relación en peso del agonista de TLR7 al Al^{+++} es menor de 5:1.

6. La composición de la reivindicación 5, en donde la relación en peso del agonista de TLR7 al Al^{+++} es menor de 3:1.

7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una dosis baja de cada uno del toxoide diftérico, el toxoide tetánico y el toxoide pertussis.

8. La composición de la reivindicación 7, en donde la composición tiene ≤8 Lf/ml de toxoide diftérico.

9. La composición de la reivindicación 7 u 8, en donde la composición tiene ≤3,5 Lf/ml de toxoide tetánico.

10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el antígeno de pertussis acelular tiene ≤5 µg/ml de toxoide pertussis.

11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la composición comprende una dosis baja de conjugado de Hib.

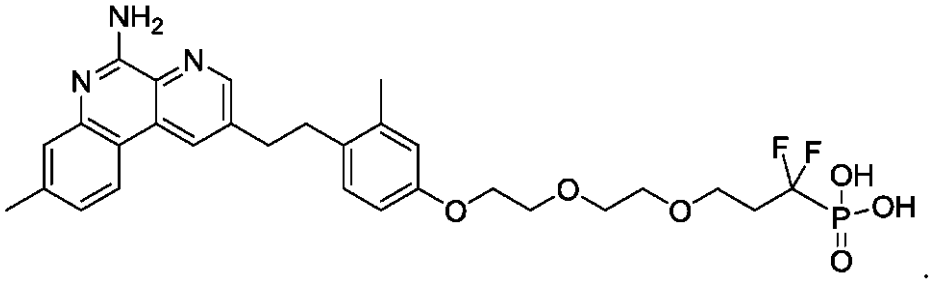
12. La composición de la reivindicación 11, en donde la composición tiene <5 µg/ml de sacárido de Hib.

13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde la composición comprende una dosis baja de HBsAg.

14. La composición de la reivindicación 13, en donde la composición tiene <5 µg/ml de HBsAg.

15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, en donde la composición comprende una dosis baja de poliovirus inactivado, opcionalmente en donde la composición tiene (i) <20 UD/ml de poliovirus de tipo 1 y/o (ii) <4 UD/ml de poliovirus de tipo 2 y/o (iii) <16 UD/ml de poliovirus de tipo 3.

16. La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde el agonista de TLR7 es



17. La composición de cualquier reivindicación precedente, que incluye sacárido capsular conjugado de uno o más de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 y/o Y.

18. La composición de cualquier reivindicación precedente, que incluye sacárido capsular conjugado de uno o más

de los serotipos neumocócicos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y/o 33F.

19. La composición de cualquier reivindicación precedente, que incluye (i) un antígeno proteína de unión al factor H meningocócico y/o (ii) un antígeno de Neisseria de unión a heparina y/o (iii) un antígeno NhhA meningocócico y/o (iv) una vesícula de membrana externa meningocócica.