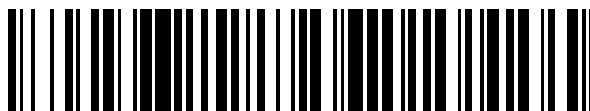


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 529**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

C07H 3/00 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2006** **PCT/EP2006/006188**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.01.2007** **WO07000314**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2006** **E 06754582 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** **EP 1896061**

54 Título: **Composición inmunogénica**

30 Prioridad:

27.06.2005 GB 0513071

27.06.2005 GB 0513069

28.07.2005 GB 0515556

28.11.2005 GB 0524204

21.12.2005 GB 0526040

21.12.2005 GB 0526041

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BIEMANS, RALPH L.;
BOUTRIAU, DOMINIQUE;
CAPIAU, CARINE;
DENOEL, PHILIPPE;
DUVIVIER, PIERRE y
POOLMAN, JAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 741 529 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

Composición inmunogénica

5 La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* conjugados con una proteína vehículo. También se refiere a vacunas y kits de vacunas que comprenden conjugados de polisacárido de *N. meningitidis*, procesos para fabricar las composiciones inmunogénicas y vacunas y el uso de las vacunas y composiciones inmunogénicas de la invención en terapia. También se refiere a las composiciones inmunogénicas proporcionadas para su uso en métodos de inmunización frente a la infección por

10 Neisseria.

Neisseria meningitidis es un patógeno humano Gram-negativo que causa meningitis bacteriana. Basándose en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado doce serogrupos de *N. meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y y Z). El serogrupo A (MenA) es la causa más común de enfermedad epidémica en África subsahariana.

15 Los serogrupos B y C son responsables de la mayoría de los casos en los países en desarrollo, y los casos restantes son causados por W135 e Y).

En la técnica se conocen composiciones inmunogénicas que comprenden sacáridos de *N. meningitidis* conjugados con proteínas transportadoras. Por ejemplo, el documento WO 02/58737 desvela una vacuna que comprende polisacáridos capsulares purificados de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis* conjugados con una proteína vehículo. Sin embargo, la presente solicitud enseña que los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* extraídos se deberían despolimerizar calentándolos en una solución de peróxido de hidrógeno antes de la conjugación.

20

El documento WO 03/07985 desvela vacunas conjugadas que comprenden sacárido de *N. meningitidis* seleccionado entre los serogrupos A, C, W135 e Y. Los polisacáridos capsulares meningocócicos se extraen y a continuación se hidrolizan de modo que se usa una selección de oligosacáridos obtenidos a partir de los polisacáridos capsulares para su conjugación con una proteína vehículo.

25

El documento WO 04/103400 también desvela conjugado de polisacárido-proteína obtenido a partir de meningococo multivalente que contiene polisacáridos capsulares obtenidos a partir de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. La presente solicitud enseña que, en lugar de usar el polisacárido capsular nativo grande, se prefiere el uso de polisacáridos meningocócicos de un tamaño más pequeño. Sugiere que los polisacáridos capsulares se despolimerizan parcialmente usando condiciones oxidantes suaves para dar un tamaño promedio de menos de 100.000 daltons, preferentemente de 12.000 a 25.000 daltons.

30

35

Sigue existiendo la necesidad de desarrollar vacunas conjugadas mejoradas frente a la meningitis por neisseria. La presente invención se refiere a la provisión de una vacuna conjugada de polisacárido meningocócico en la que el tamaño de los polisacáridos es mayor que el que se enseña en la bibliografía. El enfoque de la técnica ha sido usar oligosacáridos para facilitar la producción de conjugados. Los inventores han descubierto que mediante el uso de conjugados de polisacárido nativos o de tamaño pequeño, se pueden obtener una o más de las siguientes ventajas: 1) un conjugado que tiene alta inmunogenicidad que se puede filtrar; 2) se puede mejorar la memoria inmunológica (al igual que en el ejemplo tres); 3) la alteración de la proporción de polisacárido con respecto a proteína en el conjugado de un modo tal que la proporción de polisacárido con respecto a proteína (p/p) en el conjugado se pueda aumentar (esto puede dar como resultado una reducción del efecto de supresión del vehículo); 4) los conjugados inmunogénicos susceptibles de hidrólisis (tal como los conjugados MenA) se pueden estabilizar mediante el uso de polisacáridos más grandes para la conjugación. El uso de polisacáridos más grandes puede dar como resultado una mayor reticulación con el vehículo conjugado y, por lo tanto, menos escisión del sacárido libre del conjugado. Las vacunas conjugadas que se han descrito en la técnica anterior tienden a despolimerizar los polisacáridos antes de la conjugación para mejorar la conjugación. La presente invención se dirige a una estrategia diferente y muestra sorprendentemente que las vacunas conjugadas meningocócicas que retienen un tamaño mayor de polisacárido proporcionan una buena respuesta inmunológica frente a la enfermedad meningocócica.

40

45

50

Por lo tanto, en un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición inmunogénica que no usa ningún adyuvante de sal de aluminio o no usa ningún adyuvante, comprendiendo la composición polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno de los serogrupos A, C, W135 e Y conjugados con una proteína vehículo para producir un conjugado de polisacárido capsular de *N. meningitidis*, en el que el tamaño promedio de cada polisacárido de *N. meningitidis* es superior a 50 kDa, en el que cada polisacárido de *N. meningitidis* se conjuga con el vehículo de toxoide del tétano y es un polisacárido nativo o se dimensiona por microfluidización, en el que dicha composición comprende un polisacárido capsular MenC conjugado con toxoide del tétano y dicho polisacárido capsular MenC tiene un tamaño promedio de 150-210 kDa.

55

60

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un kit de vacuna para administración simultánea

o secuencial que comprende dos composiciones inmunogénicas multivalentes para proporcionar protección en un hospedador frente a una enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, comprendiendo dicho kit un primer recipiente que comprende:

5 toxoide del tétano (TT),
 toxoide de difteria (DT), y
 componentes de células completas o acelulares de pertussis
 y un segundo recipiente que comprende:
 10 la composición inmunogénica de la invención.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un proceso para preparar la vacuna de la invención que comprende la etapa de mezclar la composición inmunogénica de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición inmunogénica de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis*.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un uso de la composición inmunogénica o vacuna de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por *Neisseria meningitidis*.

Descripción de las figuras

25 **Figura 1 - A** – Gráfico de barras que muestra respuestas de GMC en un ELISA anti-MenY. ENYTT012 es un conjugado de MenY-TT preparado a partir del polisacárido MenY nativo. ENYTT014 es un conjugado de MenY-TT preparado a partir del polisacárido MenY microfluidizado que se había sometido a 40 ciclos de microfluidización. ENYTT015bis es un conjugado de MenY-TT preparado a partir del polisacárido MenY microfluidizado que se había sometido a 20 ciclos de microfluidización.

30 - B - Gráfico de barras que muestra respuestas de GMT en un ensayo anti-MenY SBA. ENYTT012 es un conjugado de MenY-TT preparado a partir del polisacárido MenY nativo. ENYTT014 es un conjugado de MenY-TT preparado a partir del polisacárido MenY microfluidizado que se había sometido a 40 ciclos de microfluidización. ENYTT015bis es un conjugado de MenY-TT preparado a partir del polisacárido MenY microfluidizado que se había sometido a 20
 35 ciclos de microfluidización.

Descripción detallada

Una composición inmunogénica de la invención es una que no usa ningún adyuvante de sal de aluminio o no usa ningún adyuvante, comprendiendo la composición polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno de los serogrupos A, C, W135 e Y conjugados con una proteína vehículo para producir un conjugado de polisacárido capsular de *N. meningitidis*, en el que el tamaño promedio de cada polisacárido de *N. meningitidis* es superior a 50 kDa, en el que cada polisacárido de *N. meningitidis* se conjuga con el vehículo de toxoide del tétano y es un polisacárido nativo o se dimensiona por microfluidización, en el que dicha composición comprende un polisacárido capsular MenC conjugado con toxoide del tétano y dicho polisacárido capsular MenC tiene un tamaño promedio de 150-210 kDa. La composición inmunogénica de la invención puede comprender polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína vehículo, en la que el tamaño promedio (peso molecular promedio en peso; Pm) de al menos uno, dos, tres o cuatro de cada polisacárido de *N. meningitidis* es superior a 50 kDa.

50 También se desvela una composición inmunogénica que comprende polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína vehículo, en la que al menos un, dos, tres o cuatro de cada polisacárido de *N. meningitidis* es cualquiera de un polisacárido nativo o se dimensiona en un factor de hasta x1,5, x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 o x10 con respecto al peso molecular promedio en peso del polisacárido nativo. Una composición inmunogénica de la invención comprende un polisacárido capsular MenC conjugado con toxoide del tétano y dicho polisacárido capsular MenC tiene un tamaño promedio de 150-210 kDa.

60 Para los fines de la invención, "polisacárido nativo" se refiere a un polisacárido que no se ha sometido a un proceso, cuya finalidad es reducir el tamaño del polisacárido. El tamaño de un polisacárido se puede llegar a reducir ligeramente durante los procedimientos de purificación normales. Un polisacárido de ese tipo aún es nativo. Solo se podría considerar que el polisacárido no es nativo si el polisacárido se ha sometido a técnicas de dimensionamiento.

65 Para los fines de la invención, "dimensionado en un factor de hasta x2" se refiere a que el polisacárido está sujeto un proceso destinado a reducir el tamaño del polisacárido pero que retiene un tamaño superior a la mitad del tamaño del polisacárido nativo. X3, x4 etc., se deben interpretar del mismo modo, es decir, el polisacárido está sujeto a un

proceso destinado a reducir el tamaño del polisacárido pero retiene un tamaño de más de un tercio, un cuarto, etc., del tamaño del polisacárido nativos respectivamente.

También se desvela una composición inmunogénica que comprende polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína vehículo, en la que al menos un, dos, tres o cuatro de cada polisacárido de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo.

También se desvela una composición inmunogénica que comprende polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína vehículo, en la que al menos un, dos, tres o cuatro de cada polisacárido de *N. meningitidis* se dimensiona en un factor de x1,5, x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 o x10.

También se desvelan composiciones inmunogénicas que opcionalmente comprenden conjugados de: polisacárido capsular del serogrupo C (MenC), polisacárido capsular del serogrupo A (MenA), polisacárido capsular del serogrupo W135 (MenW), polisacárido capsular del serogrupo Y (MenY), polisacáridos capsulares de los serogrupos C e Y (MenCY), polisacáridos capsulares de los serogrupos C y A (MenAC), polisacáridos capsulares de los serogrupos C y W (MenCW), polisacáridos capsulares de los serogrupos A e Y (MenAY), polisacáridos capsulares de los serogrupos A y W (MenAW), polisacáridos capsulares de los serogrupos W e Y (Men WY), polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C y W (MenACW), polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C e Y (MenACY); polisacáridos capsulares de los serogrupos A, W135 e Y (MenAWY), polisacáridos capsulares C, W135 e Y de los serogrupos (MenCWY); o polisacáridos capsulares A, C, W135 e Y de los serogrupos (MenACWY) de *N. meningitidis*. Esta es la definición de "un, dos, tres o cuatro", o "al menos uno de "los serogrupos A, C, W e Y, o de cada uno de polisacárido de *N. meningitidis* cuando se menciona en el presente documento.

En una realización, el tamaño promedio (o peso molecular) de al menos uno, dos, tres, cuatro de cada polisacárido de *N. meningitidis* es 50 KDa - 1500 kDa, 50 kDa - 500 kDa, 50 kDa - 300 KDa, 101 kDa - 1500 kDa, 101 kDa - 500 kDa, o 101 kDa - 300 kDa tal como se determina por MALLS.

En una realización, el polisacárido MenA, cuando está presente, tiene un peso molecular de 50-500 kDa, 50-100 kDa, 100-500 kDa, 55-90 KDa, 60-70 kDa o 70-80 kDa o 60-80 kDa tal como se determina por MALLS.

Una composición inmunogénica de la invención comprende un polisacárido capsular MenC conjugado con toxoide del tétano y dicho polisacárido capsular MenC tiene un tamaño promedio de 150-210 kDa. En una realización, el polisacárido MenC tiene un peso molecular de 180-210 kDa tal como se determina por MALLS.

En una realización el polisacárido MenY, cuando está presente, tiene un peso molecular de 60-190 kDa, 70-180 kDa, 80-170 kDa, 90-160 kDa, 100-150 kDa o 110-140 kDa, 50-100 kDa, 100-140 kDa, 140-170 kDa o 150-160 kDa tal como se determina por MALLS.

En una realización el polisacárido MenW, cuando está presente, tiene un peso molecular de 60-190 kDa, 70-180 kDa, 80-170 kDa, 90-160 kDa, 100-150 kDa, 110-140 kDa, 50-100 kDa o 120-140 kDa tal como se determina por MALLS.

En el presente documento el peso molecular o peso molecular promedio de un polisacárido se refiere al peso molecular promedio en peso (Pm) del polisacárido medido antes de su conjugación y se mide por MALLS.

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

En una realización los polisacáridos de *N. meningitidis* son polisacáridos nativos o polisacáridos nativos que tienen una reducción del tamaño durante un proceso de extracción normal.

En una realización, los polisacáridos de *N. meningitidis* se dimensiona mediante escisión mecánica, por ejemplo mediante microfluidización o sonicación. La microfluidización y la sonicación tienen la ventaja de disminuir el tamaño de los polisacáridos nativos más grandes lo suficiente como para proporcionar un conjugado que se puede filtrar. El dimensionamiento se realiza en un factor no superior a x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, x2 o x1,5.

También se describe una composición inmunogénica que comprende conjugados de *N. meningitidis* que se preparan a partir de una mezcla de polisacáridos nativos y polisacáridos que se dimensiona en un factor no superior a x20. Por ejemplo, los polisacáridos de MenC y/o MenA son nativos. Por ejemplo, los polisacáridos de MenY y/o MenW se dimensionan en un factor no superior a x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, x2 o x1,5. Por ejemplo, una composición inmunogénica contiene un conjugado preparado a partir de MenY y/o MenW y/o MenC y/o MenA que está

dimensionado en un factor no superior a x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, x2 o x1,5 y/o está microfluidizado. Por ejemplo, una composición inmunogénica contiene un conjugado preparado a partir de MenA y/o MenC y/o MenW y/o MenY nativos. Por ejemplo, una composición inmunogénica comprende un conjugado preparado a partir de MenC nativo. Por ejemplo, una composición inmunogénica comprende un conjugado preparado a partir de MenC y MenA nativos que se dimensiona en un factor no superior a x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, x2 o x1,5 y/o se microfluidiza. Por ejemplo, una composición inmunogénica comprende un conjugado preparado a partir de MenC y MenY nativos que se dimensionan en un factor no superior a x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, x2 o x1,5 y/o se microfluidiza.

En una realización, la polidispersión del polisacárido es 1-1,5, 1-1,3, 1-1,2, 1-1,1 o 1-1,05 y después de su conjugación a una proteína vehículo, la polidispersión del conjugado es 1,0-2,5, 1,0-2,0, 1,0-1,5, 1,0-1,2, 1,5-2,5, 1,7-2,2 o 1,5-2,0. Todas las mediciones de polidispersión se realizan por MALLS.

Los polisacáridos se dimensionan opcionalmente hasta 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 veces a partir del tamaño del polisacárido aislado a partir de las bacterias.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención además comprende un antígeno del serogrupo B de *N. meningitidis*. El antígeno es opcionalmente un polisacárido capsular del serogrupo B (MenB) de *N. meningitidis* o un polisacárido u oligosacárido dimensionado obtenido a partir del mismo. El antígeno es opcionalmente una preparación de vesículas de membrana externa del serogrupo B de *N. meningitidis* como se describe en los documentos EP301992, WO 01/09350, WO 04/14417, WO 04/14418 y WO 04/14419.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende además un sacárido capsular b (Hib) de *H. influenzae* conjugado a una proteína vehículo.

El polisacárido o polisacáridos de *N. meningitidis* (y opcionalmente el sacárido capsular Hib) incluidos en las composiciones farmacéuticas de la invención cada uno se conjugan al vehículo de toxoide del tétano. Opcionalmente el Hib se puede conjugar al fragmento C de toxoide del tétano, mutantes no tóxicos de la toxina del tétano, toxoide de difteria, CRM197, otros mutantes no tóxicos de la toxina de difteria [tal como CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida *et al* J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; delección o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones desveladas en los documentos US 4709017 o US 4950740; mutación de al menos una o más restos de Lys 516, Lys 526, Phe 530 Y/o Lys 534 y otras mutaciones desveladas en los documentos US 5917017 o US 6455673; o fragmento desvelado en el documento US 5843711], neumolisina neumocócica, OMPC (proteínas de membrana externa meningocócica – normalmente extraída del serogrupo B de *N. meningitidis* – documento EP0372501), péptidos sintéticos (documentos EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas de pertussis (documentos WO 98/58668, EP0471177), citoquinas, linfoquinas, factores u hormonas de crecimiento (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4+ humanos de diversos antígenos obtenidos a partir de patógenos (Falugi *et al* (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) tal como proteína N19 (Baraldoi *et al* (2004) Infect Immun 72; 4884-7) proteína PspA de superficie neumocócica (documento WO 02/091998) neumolisina (Kuo *et al* (1995) Infect Immun 63; 2706-13), proteínas de absorción de hierro (documento WO 01/72337), toxinas A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761) o Proteína D (documentos EP594610 y WO 00/56360). En una composición inmunogénica de la invención el polisacárido capsular MenC está conjugado con toxoide del tétano.

La composición inmunogénica de la invención usa Toxoides del Tétano para cada polisacárido de *N. meningitidis* (independientemente). En una realización cuando Hib está presente, Hib se puede conjugar con la misma proteína vehículo.

En una realización, una sola proteína vehículo puede llevar más de un antígeno sacárido (documento WO 04/083251). Por ejemplo, una sola proteína vehículo se podría conjugar con MenA y MenC; MenA y MenW; MenA y MenY; MenC y MenW; MenC y MenY; Men W y MenY; MenA, MenC y MenW; MenA, MenC y MenY; MenA, MenW y MenY; MenC, MenW y MenY; MenA, MenC, MenW y MenY; Hib y MenA; Hib y MenC; Hib y MenW; o Hib y MenY.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende un sacárido Hib conjugado con una proteína vehículo seleccionada entre el grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT y proteína D.

También se desvela una composición inmunogénica que comprende al menos un conjugado de sacárido meningocócico (por ejemplo MenA; MenC; MenW; MenY; MenA y MenC; MenA y MenW; MenA y MenY; MenC y Men W; Men C y MenY; Men W y MenY; MenA, MenC y MenW; MenA, MenC y MenY; MenA, MenW y MwnY; MenC, MenW y MenY o MenA, MenC, MenW y MenY) que tiene una proporción de sacárido Men con respecto a proteína vehículo entre 1:5 y 5:1, entre 1:2 y 5:1, entre 1:0,5 y 1:2,5 o entre 1:1,25 y 1:2,5 (p/p).

La composición inmunogénica de la invención comprende opcionalmente un conjugado de sacárido Hib que tiene una proporción de Hib con respecto a proteína vehículo entre 1:5 y 5:1; 1:2 y 2:1; 1:1 y 1:4; 1:2 y 1:3,5; o aproximadamente o exactamente 1:2,5 o 1:3 (p/p). Por 'aproximadamente' se hace referencia a dentro de un 10 %

de la proporción indicada.

La proporción de sacárido con respecto a proteína vehículo (p/p) en un conjugado se puede determinar usando el conjugado esterilizado. La cantidad de proteína se determina usando un ensayo de Lowry (por ejemplo Lowry *et al* (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275 o Peterson *et al* Analytical Biochemistry 100, 201-220 (1979)) y la cantidad de sacárido se determina usando ICP-OES (espectroscopia de emisión óptica con plasma inductivamente Acoplado) para MenA, ensayo de DMAP para MenC y ensayo de Resorcinol para MenW y MenY (Monsigny *et al* (1988) Anal. Biochem. 175, 525-530).

En una realización, la composición inmunogénica de la invención el polisacárido o polisacáridos de *N. meningitidis* y/o el sacárido Hib se conjugan con la proteína vehículo a través de un conector, por ejemplo un conector difuncional. El conector es opcionalmente heterobifuncional u homobifuncional, que tiene por ejemplo un grupo amino reactivo y un grupo ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amino reactivos o dos grupos ha sido carboxílico reactivos. El conector tiene por ejemplo entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un posible conector es ADH. Otros conectores incluyen B-propionamido (documento WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gever *et al* (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), haluros de haloalquilo (documento US4057685), enlaces glicosídicos (documentos US4673574, US4808700), hexano diamina y ácido 6-aminocaproico (documento US4459286).

Los conjugados de polisacárido presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden preparar mediante cualquier técnica de acoplamiento conocida. El método de conjugación puede depender de la activación del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. Por lo tanto el sacárido activado se puede acoplar directamente o a través de un grupo espaciador (conector) a un grupo amino en la proteína vehículo. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para dar un polisacárido tiolado que se podría acoplar al vehículo a través del enlace tioéter obtenido después de reacción con una proteína vehículo activada por maleimida (por ejemplo usando GMBS) o una proteína vehículo holoacetilada (por ejemplo usando yodoacetimida o bromoacetatobromoacetato de N-succinimido). Opcionalmente, el éster de cianato (preparado opcionalmente mediante química de CDAP) se acopla con hexano diamina o ADH y el sacárido derivatizado con amino se conjugan con la proteína vehículo usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC). Los conjugados de ese tipo se describen en la solicitud publicada de PCT WO 93/15760 Uniformed Services University y WO 95/08348 y WO 96/29094.

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

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

Un método adicional implica el acoplamiento de un sacárido activado con bromuro de cianógeno (o CDAP) derivatizado con hidrazida de ácido adipico (ADH) al vehículo de proteína por condensación de carbodiimida (Chu C. *et al* Infect. Immunity, 1983 245 256), por ejemplo usando EDAC.

En una realización, un grupo hidroxilo (opcionalmente un grupo hidroxilo activado, por ejemplo, un grupo hidroxilo activado por un éster de cianato) en un sacárido está unido a un grupo amino o carboxílico en una proteína, ya sea directa o indirectamente (a través de un conector). Cuando está presente un conectó, un grupo hidroxilo en un sacárido está opcionalmente unido a un grupo amino en un conector, por ejemplo mediante el uso de conjugación CDAP. Un grupo amino adicional en el conector (por ejemplo ADH) se puede conjugan con un grupo de ácido carboxílico en una proteína, por ejemplo usando química de carbodiimida, por ejemplo usando EDAC. En una realización, el polisacárido o polisacáridos capsular(es) Hib o de *N. meningitidis* se conjugan con el conectó primero antes de que el conector se conjugue con la proteína vehículo.

En una realización, el sacárido Hib, cuando está presente, se conjugan con la proteína vehículo usando CNBr, o CDAP, o una combinación de CDAP y química de carbodiimida (tal como EDAC), o una combinación de CNBr y química de carbodiimida (tal como EDAC). Opcionalmente, Hib se conjugan usando química de CNBr y carbodiimida, opcionalmente EDAC. Por ejemplo, CNBr se usa para unir el sacárido y el conectó en la continuación la química de la carbodiimida se usa para unir el conectó al vehículo de proteína.

En una realización, al menos uno de los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* se conjugan directamente con una proteína vehículo; opcionalmente el sacárido o sacáridos Men W y/o MenY y/o MenC se conjugan directamente con una proteína vehículo. Por ejemplo MenW; MenY; MenC; MenW y MenY; MenW y MenC; MenY y MenC; o

MenW, MenY y MenC se unen directamente a la proteína vehículo. Opcionalmente el al menos uno de los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* se conjuga directamente por CDAP. Por ejemplo MenW; MenY; MenC; MenW y MenY; MenW y MenC; MenY y MenC; o MenW, MenY y MenC se unen directamente a la proteína vehículo por CDAP (véanse los documentos WO 95/08348 y WO 96/29094). En una realización, todos los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* están conjugados con toxoide del tétano.

Opcionalmente la proporción de Men W y/o Y sacárido con respecto a proteína vehículo está entre 1:0,5 y 1:2 (p/p) y/o la proporción de MenC sacárido con respecto a proteína vehículo está entre 1:0,5 y 1:4 o 1:1,25-1:1,5 o 1:0,5 y 1:1,5 (p/p), especialmente cuando éstos sacáridos se unen directamente a la proteína, opcionalmente usan CDAP.

En una realización, al menos uno del polisacárido o polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* se conjuga con la proteína vehículo a través de un conector, por ejemplo un conector difuncional. El conector es opcionalmente heterobifuncional u homobifuncional, que tienen por ejemplo un grupo amino reactivo y un grupo ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amino reactivos o 2 grupos acilo carboxílico reactivos. El conector tiene por ejemplo entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un conector posible es ADH.

En una realización, MenA; MenC; o MenA y MenC se conjuga con una proteína vehículo (por ejemplo toxoide del tétano) a través de un conector.

En una realización, al menos un polisacárido de *N. meningitidis* se conjuga con una proteína vehículo a través de un conector usando CDAP y EDAC. Por ejemplo, MenA; MenC; o MenA y MenC se conjugan con una proteína a través de un conector (por ejemplo los que tienen dos grupos hidrozino en sus extremos tal como ADH) usando CDAP y EDAC como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, CDAP se usa para conjugar el sacárido ha un conector y EDAC se usa para conjugar el conector a una proteína. Opcionalmente, la conjugación a través de un conector da como resultado una proporción de polisacárido con respecto a proteína vehículo entre 1:0,5 y 1:6; 1:1 y 1:5 o 1:2 y 1:4, para MenA; MenC; o MenA y MenC.

En una realización, el polisacárido capsular MenA, cuando está presente, está al menos parcialmente O-acilado de modo que al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 98 % de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una posición. La O-acetilación está presente por ejemplo al menos en la posición O-3 de al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 98 % de las unidades de repetición.

En una realización, el polisacárido capsular MenC está al menos parcialmente O-acetilado de modo que al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 98 % de las unidades de repetición de unido en NeuNAc ($\alpha 2 \rightarrow 9$) están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones. La O-acetilación está presente por ejemplo en la posición O-7 y/o O-8 de al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 98 % de las unidades de repetición.

En una realización, el polisacárido capsular MenW, cuando está presente está al menos parcialmente O-acetilado de modo que al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 98 % de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones. La O-acetilación está presente por ejemplo en la posición O-7 y/o O-9 de al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 98 % de las unidades de repetición.

En una realización, el polisacárido capsular MenY, cuando está presente está al menos parcialmente O-acetilado de modo que al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones. La O-acetilación está presente en la posición 7 y/o 9 de al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 98 % de las unidades de repetición.

El porcentaje de O-acetilación se refiere al porcentaje de las unidades de repetición que contienen O-acetilación. Esto se puede medir en el polisacárido antes de la conjugación y/o después de la conjugación.

En una realización adicional, la composición inmunogénica de la invención comprende un conjugado de sacárido Hib y al menos dos conjugados de polisacárido de *N. meningitidis* en la que el conjugado de Hib está presente en una dosis de sacárido más baja que la dosis de sacárido media de los al menos dos conjugados de polisacárido de *N. meningitidis*. Como alternativa, el conjugado de Hib está presente en una dosis de sacárido más baja que la dosis de sacárido de cada uno de los al menos dos conjugados de polisacárido de *N. meningitidis*. Por ejemplo, la dosis del conjugados de conjugado Hib puede ser al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o un 80 % más baja que la dosis de sacárido media o más baja de los al menos dos conjugados de polisacárido de *N. meningitidis* adicionales.

El término "sacárido" incluye polisacáridos u oligosacáridos. Los polisacárido se aíslan de bacterias o se aíslan de bacterias y se dimensionan en cierto grado mediante métodos conocidos (véanse por ejemplo los documentos EP497524 y EP497525) y opcionalmente mediante microfluidización. Los polisacáridos se pueden dimensionar con el fin de reducir la viscosidad de las muestras de polisacárido y/o para mejorar la capacidad de filtración de productos conjugados. Los oligosacáridos se caracterizan porque generalmente son polisacáridos hidrolizados con un bajo número de unidades de repetición (por lo general 5-30 unidades de repetición).

La dosis media se determina mediante adición de las dosis de todos los polisacáridos adicionales y dividiendo entre el número de polisacáridos adicionales. Los polisacáridos adicionales en todos los polisacáridos dentro de la composición inmunogénica excepto Hib y pueden incluir polisacáridos capsulares de *N. meningitidis*. La "dosis" está en la cantidad de la composición inmunogénica o vacuna que se administra a un ser humano.

5 Un sacárido Hib es el polisacárido capsular fosfato de polirribosilo (PRP) de *Haemophilus influenzae* de tipo b o un oligosacárido obtenido a partir del mismo.

10 'Al menos dos conjugados de sacárido bacteriano adicionales' se debe tomar como haciendo referencia al menos dos conjugados de sacárido bacterianos adicionales bacterial además de un conjugado de Hib. Los al menos dos conjugados bacterianos adicionales pueden incluir conjugados de polisacárido capsular de *N. meningitidis*.

15 Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender conjugados de sacárido adicionales obtenidos a partir de uno o más de of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, Streptococci del Grupo A, Streptococci del Grupo B, *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*. En una realización, la composición inmunogénica comprende polisacáridos u oligosacáridos capsulares obtenidos a partir de uno o más de los serogrupos A, C, W135 y Y de *Neisseria meningitidis*. Una realización adicional comprende polisacáridos u oligosacáridos capsulares obtenidos a partir de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de polisacárido u oligosacárido capsular neumocócico se seleccionan opcionalmente entre los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 20 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (opcionalmente entre los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). una realización adicional comprende el Tipo 5, Tipo 8 o 336 de polisacáridos u oligosacáridos capsulares de *Staphylococcus aureus*. Una realización adicional comprende el Tipo I, Tipo II o Tipo III de polisacáridos capsulares de *Staphylococcus epidermidis*. Una realización adicional comprende el sacárido Vi (poli u oligosacárido) de *S. typhi*. Una realización adicional comprende el Tipo Ia, Tipo Ic, Tipo II, Tipo III o Tipo V de polisacáridos u oligosacáridos capsulares de *Streptococcus* del Grupo B. Una realización adicional comprende los polisacáridos u oligosacáridos capsulares de *Streptococcus* del Grupo A, comprendiendo además opcionalmente al menos una proteína M y opcionalmente múltiples tipos de proteína M.

25 En una realización, la composición inmunogénica de la invención contiene cada polisacárido capsular de *N. meningitidis* a una dosis entre 0,1-20 µg; 1-10 µg; 2-10 µg, 2,5-5 µg, aproximada o exactamente 5 µg; o aproximada o exactamente 2,5 µg.

30 En una realización, la composición inmunogénica de la invención por ejemplo contiene el conjugado de sacárido Hib a una dosis de sacárido entre 0,1 y 9 µg; 1 y 5 µg o 2 y 3 µg o aproximada o exactamente 2,5 µg y cada uno de los conjugados de polisacárido de *N. meningitidis* a una dosis de sacárido entre 2 y 20 µg, 3 y 10 µg, o entre 4 y 7 µg o aproximada o exactamente 5 µg.

35 "Alrededor de" o "aproximadamente" son tal como se definen dentro de un 10 % más o menos del número dado para los fines de la invención.

40 En una realización, la composición inmunogénica de la invención contiene una dosis de sacárido del conjugado de sacárido Hib que es por ejemplo inferior a un 90 %, 80 %, 75 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o un 10 % de la dosis media de sacárido de al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de polisacárido de *N. meningitidis*. La dosis de sacárido del sacárido Hib está por ejemplo entre un 20 % y 60 %, 30 % y 60 %, 40 % y un 45 60 % o aproximada o exactamente un 50 % de la dosis media de sacárido de al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de polisacárido de *N. meningitidis*.

50 En una realización, la composición inmunogénica de la invención contiene una dosis de sacárido del conjugado de sacárido Hib que es por ejemplo inferior a un 90 %, 80 %, 75 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o un 10 % de la dosis de sacárido más baja de al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de polisacárido de *N. meningitidis*. La dosis de sacárido del sacárido Hib está por ejemplo entre un 20 % y 60 %, 30 % y 60 %, 40 % y 60 % o aproximada o exactamente 50 % de la dosis de sacárido más baja de al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de polisacárido de *N. meningitidis*.

55 En una realización de la invención, la dosis de sacárido de cada uno de al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de polisacárido de *N. meningitidis* estacionalmente la misma, o aproximadamente la misma.

Los ejemplos de composiciones inmunogénicas de la invención son como que consisten en o que comprenden:

60 conjugado Hib y conjugado MenA y conjugado MenC, opcionalmente a proporciones de dosis de sacárido de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacárido de MenA es mayor que la dosis de sacárido de MenC.
conjugado Hib y conjugado MenC y conjugado MenY, opcionalmente a proporciones de dosis de sacárido de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacárido de MenC es mayor que la dosis de sacárido de MenY.
65 conjugado Hib y conjugado MenC y conjugado MenW, opcionalmente a proporciones de dosis de sacárido de

1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente la dosis de sacárido de MenC es mayor que la dosis de sacárido de MenW.

conjugado Hib y conjugado MenA y conjugado MenW, opcionalmente a proporciones de dosis de sacárido de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacárido de MenA es mayor que la dosis de sacárido de MenW.

MenA, MenC, MenW y MenY a proporciones de dosis de sacárido de 1:1:1:1 o 2:1:1:1 o 1:2:1:1 o 2:2:1:1 o 1:3:1:1 o 1:4:1:1 (p/p).

Un aspecto adicional de la invención es una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención se tampona a, o se ajusta a, entre pH 7,0 y 8,0, pH 7,2 y 7,6 o aproximada o exactamente pH 7,4.

La composición o vacunas inmunogénicas de la invención se liofilizan opcionalmente en presencia de un agente estabilizante por ejemplo un poliol tal como sacarosa o trehalosa.

Opcionalmente, la composición o vacuna inmunogénica de la invención contiene la cantidad de un adyuvante suficiente para aumentar la respuesta inmunológica al agente inmunógeno. Los ayudantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, mezclas de escualeno (SAF-1), péptido de muramilo, derivados de saponina, preparaciones de pared celular de micobacterias, monofosforil lípido A, derivados de ácido micólico, tensioactivos de copolímero de bloque no iónico, Quil A, subunidad de toxina B del cólera, polifosfaceno y derivados, y complejos inmunoestimulantes (los ISCOM) tal como los descritos por Takahashi *et al.* (1990) Nature 344: 873-875.

Para las combinaciones de *N. meningitidis* o HibMen discutidas anteriormente, puede ser ventajoso no usar ningún adyuvante. La composición inmunogénica de la invención no comprende un adyuvante de sal de aluminio.

Como con todas las composiciones o vacunas inmunogénicas, las cantidades inmunológicamente eficaces de los inmunógenos se deben determinar por vía empírica. Los factores a considerar incluyen la inmunogenicidad, tanto si el inmunógeno forma complejo con o se une covalente mente a un adyuvante o proteína vehículo u otro vehículo, vías de administración y el número de dosificaciones de inmunización que se van a administrar. Los factores de ese tipo se conocen en la técnica de la vacuna y bien dentro de la habilidad de los inmunólogos está hacer tales determinaciones sin experimentación excesiva.

El agente activo puede estar presente en concentraciones variables en la composición farmacéutica de la vacuna de la invención. Por lo general, la concentración mínima de la sustancia es una cantidad necesaria para conseguir su uso previsto, mientras que la concentración máxima es la cantidad máxima que permanecerá en solución o suspendida homogéneamente dentro de la mezcla inicial. Por ejemplo, la cantidad mínima de un agente terapéutico es opcionalmente una que proporcionará una única dosificación terapéuticamente eficaz. Para las sustancias bioactivas, la concentración mínima es una cantidad necesaria para la bioactividad tras la reconstitución y la concentración máxima está en el punto en el que no se puede mantener una suspensión homogénea. En el caso de unidades de dosificación única, la cantidad es la de una sola aplicación terapéutica. En general, se espera que cada dosis comprenda 1-100 µg de antígeno de proteína, opcionalmente 5-50 µg o 5-25 µg. Los ejemplos de dosis de sacáridos bacterianos son 10-20 µg, 5-10 µg, 2,5-5 µg o 1-2,5 µg. La cantidad preferente de la sustancia varía de una sustancia a otra, pero la puede determinar fácilmente alguien con experiencia en la materia.

Las preparaciones de vacuna de la presente invención se pueden usar en métodos para proteger o tratar a un mamífero (por ejemplo, un paciente humano) susceptible de infección, mediante la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosa. Un paciente humano es opcionalmente un bebé (menos de 12 meses), un niño pequeño (12-24, 12-16 o 12-14 meses), un niño (2-10, 3-8 o 3-5 años) y un adolescente (12 -25, 14-21 o 15-19 años) o un adulto (cualquier edad mayor de 12, 15, 18 o 21). Estas administraciones pueden incluir inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o vía administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Se prefiere la administración intranasal de vacunas para el tratamiento de la neumonía o la otitis media (ya que el transporte nasofaríngeo de neumococos se puede prevenir de manera más eficaz, lo que atenúa la infección en su etapa más temprana). Aunque la vacuna de la invención se puede administrar como una dosis única, sus componentes también se pueden administrar en conjunto al mismo tiempo o en diferentes momentos (por ejemplo, si los sacáridos están presentes en una vacuna, estos se podrían administrar por separado al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de una vacuna de proteína bacteriana para una coordinación óptima de las respuestas inmunes entre sí). Además de una vía de administración única, se pueden usar 2 días de administración diferentes. Por ejemplo, los antígenos virales se pueden administrar por vía ID (intradérmica), mientras que las proteínas bacterianas se pueden administrar por vía IM (intramuscular) o por vía IN (intranasal). Si los sacáridos están presentes, se pueden administrar por vía IM (o ID) y las proteínas bacterianas se pueden administrar por vía IN (o ID). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar por vía IM para dosis de cebado y por vía IN para dosis de refuerzo.

La preparación de vacuna se describe generalmente en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds

Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). La encapsulación dentro de liposomas se describe en Fullerton, documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.235.877.

Un aspecto adicional de la invención es un kit de vacuna para administración simultánea o secuencial que comprende dos composiciones inmunogénicas multivalentes para proporcionar protección en un hospedador frente a una enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Neisseria meningitidis* y opcionalmente *Haemophilus influenzae*. Por ejemplo, el kit comprende opcionalmente un primer recipiente que comprende uno o más de:

toxoide del tétano (TT),
toxoide de difteria (DT), y
componentes de células completas o acelulares de pertussis
y un segundo recipiente que comprende cualquiera de:

una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente liofilizada.

o

conjugado de sacárido Hib, y

una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente liofilizada.

Los ejemplos de formulación del conjugado Hib y los conjugados de polisacárido de *N. meningitidis* son como se han descrito anteriormente.

Un aspecto adicional de la invención es un kit de vacuna para administración simultánea o secuencial que comprende dos composiciones inmunogénicas multivalentes para proporcionar protección en un hospedador frente a una enfermedad causada por *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* y opcionalmente *Haemophilus influenzae*. Por ejemplo, el kit comprende opcionalmente un primer recipiente que comprende uno o más de:

uno o más conjugados de una proteína vehículo y un sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* [en el que el sacárido capsular es opcionalmente de un serotipo neumocócico seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F].

y un segundo recipiente que comprende cualquiera de:

una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente liofilizada.

o

conjugado de sacárido de Hib, y

una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente liofilizada.

Los ejemplos del conjugado Hib y los conjugados de polisacárido de *N. meningitidis* son como se han descrito anteriormente.

Por lo general la vacuna de *Streptococcus pneumoniae* en el kit de vacuna de la presente invención comprenderá antígenos de sacárido (o finalmente conjugados), en el que los polisacárido se tienen a partir de al menos cuatro serotipos de neumococos elegidos entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Opcionalmente los cuatro serotipos incluyen 6B, 14, 19F y 23F. Opcionalmente, al menos 7 serotipos están incluidos en la composición, por ejemplo los obtenidos a partir de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F. Opcionalmente más de 7 serotipos están incluidos en la composición, por ejemplo al menos 10, 11, 12, 13 o 14 serotipos. Por ejemplo la composición en una realización incluye 11 polisacáridos capsulares obtenidos a partir de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (opcionalmente conjugados). En una realización de la invención al menos 13 antígenos de polisacárido (opcionalmente conjugados) están incluidos, aunque en la invención además también se contemplan antígenos de polisacárido, por ejemplo 23 valentes (tal como los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F).

También se desvela un kit de vacuna que comprende un tercer componente. Por ejemplo, el kit comprende opcionalmente un primer recipiente que comprende uno o más de:

toxoide del tétano (TT),
toxoide de difteria (DT), y
componentes de células completas o acelulares de pertussis

y un segundo recipiente que comprende :

uno o más conjugados de una proteína vehículo y un sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* [en el que el sacárido capsular es opcionalmente de un serotipo de pneumocócico seleccionar entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F].

y un tercer recipiente que comprende:

una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente liofilizada.

o

conjugado de sacárido de Hib, y

una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente liofilizada.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender además opcionalmente antígenos de sarampión y/o paperas y/o rubéola y/o varicela. Por ejemplo, la composición inmunogénica meningocócica contiene antígenos de sarampión, paperas y rubéola o sarampión, paperas, rubéola y varicela. En una realización, estos antígenos virales están opcionalmente presentes en el mismo recipiente que el conjugado o conjugados meningocócico y/o de sacárido Hib. En una realización, estos antígenos virales están liofilizados.

Un aspecto adicional de la invención es un proceso para preparar la vacuna de la invención que comprende la etapa de mezclar la composición inmunogénica de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La preparación de vacuna generalmente se describe en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). La encapsulación dentro de liposomas se describe en Fullerton, documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.235.877.

Un aspecto adicional de la invención es una composición inmunogénica de la invención para su uso en el método de inmunización de un hospedador humano frente a una enfermedad causada por *N. meningitidis* y opcionalmente una infección por *Haemophilus influenzae* que comprende la administración al hospedador de una dosis inmunoprotectora de la composición o vacuna inmunogénica o kit de la invención.

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

La invención se ilustra en los ejemplos adjuntos. Los ejemplos que siguen a continuación se llevan a cabo usando técnicas convencionales, que son bien conocidas y de rutina para los expertos en la materia, excepto cuando se describe de otro modo con detalle en cualquier parte. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 – preparación de conjugados de polisacárido

La unión covalente del polisacárido PRP de *Haemophilus influenzae* (Hib) a TT se llevó a cabo mediante una química de acoplamiento desarrollada por Chu *et al* (Infection and Immunity 1983, 40 (1); 245-256). El polisacárido PRP de Hib si activo mediante adición de CNBr e incubando a pH 10,5 durante los seis minutos. El pH se disminuyó a pH 8,75 y se añadió dihidrazida del ácido adípico (ADH) y la incubación continuó durante un periodo adicional de 90 minutos. El PRP activado se acopló a toxoide del tétano unificado a través de condensación de carbodiimida usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). La EDAC se añadió al PRP activado para alcanzar una proporción final de 0,6 mg de EDAC/mg de PRP activado. El pH se ajustó a 5,0 y el toxoide del tétano purificado se añadió para alcanzar 2 mg de TT/mg de PRP activado. La solución resultante se dejó durante tres días con agitación suave. Después de filtración a través de una membrana de 0,45 µm, el conjugado se purificó en una columna sephacryl S500HR (Pharmacia, Suecia) equilibrada en NaCl 0,2 M.

Los conjugados de MenC -TT se produjeron usando polisacáridos nativos (de aproximadamente 150 kDa tal como se mide por MALLS). Los conjugados de MenA-TT se produjeron usando cualquiera de polisacárido nativo o polisacárido ligeramente microfluidizado de aproximadamente 60 kDa tal como se mire con el método de MALLS del ejemplo 2. Los conjugados MenW y MenY-TT se produjeron usando polisacáridos dimensionado es de aproximadamente 100-200 kDa tal como se mide por MALLS (véase el ejemplo 2). El dimensión en que se realizó mediante microfluidización usando un aparato homogeneizador Emulsiflex C-50. los polisacáridos a continuación se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

La activación y el acoplamiento se llevaron a cabo como se describe en los documentos WO 96/29094 y WO 00/56360. En resumen, el polisacárido a una concentración de 10-20 mg/ml en NaCl 2 M a pH 5,5-6,0 se mezcló con la solución CDAP (100 mg/ml recién preparados en acetonitrilo/WFI, 50/50) hasta una proporción final de CDAP/polisacárido de 0,75/1 o 1,5/1. Después de 1,5 minutos, el pH se elevó con hidróxido sódico a pH 10,0.

5 Después de tres minutos, el toxoide del tétano se añadió para alcanzar una proporción de proteína/polisacárido de 1,5/1 para MenW, 1,2/1 para MenY, 1,5/1 para MenA o 1,5/1 para MenC. La reacción continuó de una a dos horas.

Después de la etapa de acoplamiento, se añadió glicina a una proporción final de glicina/PS (p/p) de 7,5/1 y el pH se ajustó a pH 9,0. La mezcla se dejó durante 30 minutos. El conjugado se aclaró usando un filtro Kleenpak de 10 µm a continuación se cargó sobre una columna Sephacryl S400HR usando un tampón de elución de NaCl 150 mM, Tris 10 mM o 5 mM a PHP,5. Los lotes clínicos se filtraron en una membrana esterilizante Opticap 4. los conjugados resultantes presentaban una proporción media de polisacárido:proteína de 1:1-1:5 (p/p).

10 Con el fin de conjugar el polisacárido capsular MenA al toxoide del tétano a través de un espaciador, se usó el siguiente método. La unión covalente del polisacárido y el espaciador (ADH) se lleva a cabo mediante química de acoplamiento mediante la cual el polisacárido se activa en condiciones controladas mediante un agente de cianilación, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP). El espaciador reacciona con el PS cianilado a través de sus grupos hidrazino, para formar un enlace de isourea estable entre el espaciador y el polisacárido.

20 Una solución de 10 mg/ml de MenA se trató con una solución recién preparada de 100 mg/ml de CDAP en acetonitrilo/agua (50/50 (v/v)) para obtener una proporción de CDAP/MenA de 0,75 (p/p). la lista inicial después de 1,5 minutos, el pH se aumentó a pH 10,0. Tres minutos más tarde, se añadió ADH para obtener una proporción de ADH/MenA de 8,9. El pH de la solución se disminuyó hasta 8,75 y la reacción evolucionó durante 2 horas.

25 Antes de la reacción de conjugación, la solución de TT purificada y la solución de PSA_{AH} se diluyeron para alcanzar una concentración de 10 mg/ml para PSA_{AH} y 10 mg/ml para TT.

EDAC se añadió a la solución de PSA_{AH} con el fin de alcanzar una proporción final de 0,9 mg de EDAC/mg de PSA_{AH}. El pH se ajustó a 5,0. El toxoide del tétano purificado se añadió con una bomba peristáltica (en 60 minutos) para alcanzar 2 mg de TT/mg de PSA_{AH}. La solución resultante se dejó 60 min a +25 °C con agitación para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 min. El conjugado se aclaró usando un filtro de 10 µm y se purificó usando una columna Sephacryl S400HR.

Ejemplo 2 – determinación del peso molecular usando MALLS

35 Los detectores se acoplaron a una columna de exclusión por tamaño de HPLC a partir de la cual se eluyeron las muestras. Por un lado, el detector de dispersión de luz láser midió las intensidades de luz dispersadas a 16 ángulos mediante la solución macromolecular y por otro lado, un refractómetro interferométrico colocado en línea permitió la determinación de la cantidad de muestra eludida. A partir de estas intensidades, se puede determinar el tamaño de la forma de las macromoléculas en solución.

40 El peso molecular medio en peso (P_m) se define como la suma de los pesos de todas las especies, multiplicado por su respectivo peso molecular y dividido entre la suma de los pesos de todas las especies.

a) Peso molecular promedio en peso: - P_m -

45

$$P_m = \frac{\sum W_i \cdot M_i}{\sum W_i} = \frac{m_2}{m_1}$$

b) Peso molecular promedio en número: - M_n -

$$M_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} = \frac{m_1}{m_0}$$

50

c) raíz cuadrada media del radio: - R_w - y R^2_w es el cuadrado del radio definido por:

$$R^2_{w o} (r^2)_w = \frac{\sum m_i \cdot r_i^2}{\sum m_i}$$

(-m_i- es la masa de un centro de dispersión i y -r_i- esa distancia entre el centro de dispersión i y el centro de gravedad de la macromolécula).

5

d) La polidispersión se define como la proporción -P_m / M_n-.

Los polisacáridos meningocócicos se analizaron por MALLS mediante carga sobre dos columnas de HPLC (TSKG6000 y 5000PWxl) usadas en combinación. Sobre la columna se cargaron 25 µl del polisacárido y se eludieron con 0,75 ml de agua filtrada. Los polisacáridos se detectan usando un detector de dispersión de luz (Wyatt Dawn DSP equipado con un láser de argón de 10 mW a 488 nm) y un refractómetro interferométrico (Wyatt Otilab DSP equipado con una celda P100 y un filtro rojo a 498 nm).

10

Las polidispersiones y recuperaciones de peso molecular de todas las fuerzas se calcularon con el método de Debye usando un ajuste polinómico del orden de 1 en el software Astra 4.72.

15

Ejemplo 3 – ensayo clínico que compara la inmunización con Meningitec o un conjugado de MenC-TT de mayor tamaño

Se llevó a cabo un estudio controlado, de fase II, abierto para comparar la vacuna de conjugado de serogrupo C meningocócico (MenC) de GSK Biologicals con la vacuna de conjugado de serogrupo C b-meningocócico de *Haemophilus influenzae* (Hib-MenC) de GSK Biological o Meningitec®. Cada dosis de Meningitec® contiene 10 µg de conjugados de oligosacárido de serogrupo C meningocócico con 15 µg de CRM197 y la produce Wyeth. Los conjugados de MenC de GSK contenían polisacáridos nativos de aproximadamente 200 kDa conjugado con toxoide del tétano (TT).

25

El estudio consistió en cinco grupos, cada uno planificado para contener 100 sujetos, situados en dos ramas paralelas o sigue a continuación: En el presente estudio, todos los sujetos en ambas ramas recibieron un quinto (1/5) de una dosis de Mencevax™ ACWY y una dosis simultánea de Infanrix™ hexa a los 12-15 meses de edad (Mes del Estudio 0). Se recogieron dos muestras de sangre de todos los sujetos (Mes del Estudio 0 y Mes del Estudio 1). La rama 1 consistió en cuatro grupos de estudio de vacunación primaria que se cebaron a las edades de 3, 4 y 5 meses con las siguientes vacunas:

30

- Grupo K: MenC (10 µg), no adsorbido sobre sales de aluminio (no ads.), conjugado de toxoide del tétano (TT) e Infanrix™ hexa (MenC10-TT + Infanrix™ hexa)
- Grupo L: Hib (10 µg)-MenC (10 µg), conjugado de TT no ads. e Infanrix™ penta (Hib10-MenC10-TT + Infanrix™ penta)
- Grupo M: Hib (5 µg)-MenC (5 µg), no ads., conjugado de TT e Infanrix™ penta (Hib5-MenC5-TT + Infanrix™ penta)
- Grupo N: Meningitec™ e Infanrix™ hexa (Meningitec™ + Infanrix™ hexa)

35

40

Los dos grupos de vacuna Hib-MenC-TT (Grupos L y M) se mantuvieron con ocultación en el estudio de estimulación como la formulación exacta de la vacuna candidata.

La rama 2-(Grupo O) consistió en sujetos emparejados por edades no vacunados previamente con una vacuna de serogrupo C meningocócico (sin tratamiento previo) pero que habían recibido vacunas pediátricas de rutina de acuerdo con la German Permanent Commission on Immunization.

45

Criterios para evaluación:

Inmunogenicidad: Determinación de títulos de anticuerpos bactericida frente a meningococo C (SBA-MenC) mediante un ensayo bactericida (punto de corte: una dilución de 1:8) y medición de ELISA de anticuerpos frente al serogrupo C meningocócico (punto de corte de ensayo: 0,3 µg/ml), el PRP del polisacárido Hib (punto de corte del ensayo: 0,15 µg/ml) y toxoide del tétano (punto de corte del ensayo: 0,1 IU/ml) en muestras de sangre obtenidas antes de la vacunación y aproximadamente un mes después de la vacunación en todos los sujetos.

55

Métodos estadísticos:

Demografía: Determinación de la edad media en meses (con mediana, intervalo y desviación estándar [DT]), y composición racial y género de las cohortes vacunadas de ATP y Total.

60

Inmunogenicidad:

Se llevaron a cabo dos análisis de inmunogenicidad basándose en la cohorte de ATP para inmunogenicidad (para análisis de memoria inmunológica y respuesta a estimulación) o la cohorte de ATP para seguridad (para análisis de persistencia). Estos incluyeron: *Evaluación de la memoria inmunológica para MenC y respuesta a estimulación para Hib y Tétano* (antes y un mes después de la administración de 1/5 de dosis de la vacuna de polisacárido sencillo):

- 5 • Determinación de los títulos de media geométrica y concentraciones (GMT y GMC) con intervalos de confianza de un 95 % (95 % de CI)
- Determinación el porcentaje de sujetos con título/concentración de anticuerpo por encima de los puntos de corte propuestos con un 95 % de CI exacto (tasas de seropositividad/seroprotección)
- 10 • Investigación de títulos/concentración de anticuerpos después de vacunación usando curvas acumulativas inversas
- Computación de un 95 % de CI asintótico estandarizado para la diferencia de la tasa de seropositividad/seroprotección
- entre el grupo cebado (Grupos K, L, M y N) y el grupo no cebado (Grupo O)
- 15 • Determinación de la media geométrica de la proporción individual de títulos de SBA-MenC con respecto a la concentración de anti-PSC, con un 95 % de CI
- Determinación del 95 % de CI para la proporción de GMT/C después de la vacunación entre los grupos K, L, M y el grupo de control N para anti-PRP y anti-tétano y entre cada grupo cebado (Grupos K, L, M y N) y el grupo no cebado (Grupo O) para SBA-MenC y anti-PSC usando un modelo de ANOVA.
- 20

Resultados

Tabla 1. Títulos de SBA-MenC y concentración de anticuerpos anti-PSC después de vacunación de refuerzo

Anticuerpo	Grupo	N	GMT/C	95 % de CL LL	95 % de CL UL
SBA-MenC	K -MenC-TT	71	3508,9	2580,1	4772,2
	L - HibMenC	79	2530,1	1831,7	3494,7
	M-HibMenC	81	5385,4	4425,0	6554,2
	N -Meningitec	85	1552,6	1044,4	2307,9
	O - Control	91	9,3	6,3	13,6
Anti-PSC	K -MenC-TT	70	28,10	22,59	34,95
	L - HibMenC	71	30,01	24,09	37,38
	M-HibMenC	76	34,58	29,10	41,09
	N -Meningitec	78	16,59	12,98	21,21
	O - Control	94	3,05	2,36	3,93

Grupo K: sujetos cebados con MenC10-TT + Infanrix. hexa; Grupo L: sujetos cebados con Hib10-MenC10-TT + Infanrix. penta; Grupo M: sujetos cebados con Hib5-MenC5-TT + Infanrix. penta; Grupo N: sujetos cebados con Meningitec. + Infanrix. hexa; Grupo O: sujetos de control (es decir, sujetos no cebados con vacuna de conjugado de MenC)

N: número de sujetos con resultados disponibles

Se consiguieron títulos más elevados de anticuerpos frente a MenC y títulos de SBA más elevados cebando con las vacunas de conjugado de polisacárido MenC de tamaño más grande (grupos K, L y M) en comparación con la vacuna de conjugado de oligosacárido Meningitec.

25

Tabla 2: Proporción de media geométrica para título de MenC de SBA/concentración anti-PSC

Grupo	Momento	N	GMR	LL	UL
K	Antes	70	49,470	34,939	70,044
	Después	66	126,138	101,419	156,882
L	Antes	76	36,528	25,849	51,621
	Después	70	90,200	70,153	115,975
M	Antes	77	51,298	36,478	72,139
	Después	74	164,950	139,304	195,318
N	Antes	84	22,571	16,521	30,837
	Después	76	90,168	67,757	119,991
O	Antes	3	91,634	0,651	12889,8
	Después	87	2,708	1,767	4,149

En los cuatro grupos cebados (Grupos K, L, M y N), el GMR aumentó de forma significativa a partir de la vacunación de refuerzo de antes a después indicando la presencia de maduración y funcionalidad de anticuerpo. El GMR en el Grupo M (cebado con Hib5-MenC5-TT) era más elevado que en el Grupo N (cebado con Meningitec™).

Tabla 3: Persistencia a los 12-15 meses de edad justo antes de la administración de las vacunas de refuerzo

Puntos finales	Grupo	N	%	Grupo	N	%	Diferencia	Valor %
SBAMenC ≥ 1:8	K	79	88,6	N	91	80,2	N-K	-8,4
	L	84	93,3	N	91	80,2	N-L	-3,1
	M	85	87,1	N	91	80,2	N-M	-6,8

(continuación)

Puntos finales	Grupo	N	%	Grupo	N	%	Diferencia	Valor %
SBAMenC ≥ 1:128	K	79	65,8	N	91	51,6	N-K	-14,2
	L	84	56,0	N	91	51,6	N-L	-4,3
	M	85	64,7	N	91	51,6	N-M	-13,1
Anti-PSC ≥ 0,3 µg/ml	K	79	100,0	N	91	100,0	N-K	0,0
	L	84	100,0	N	91	100,0	N-L	0,0
	M	88	98,9	N	91	100,0	N-M	1,1
Anti-PSC ≥ 2 µg/ml	K	79	72,2	N	91	81,3	N-K	9,2
	L	84	64,3	N	91	81,3	N-L	17,0
	M	88	64,3	N	91	81,3	N-M	8,6
Anti-PRP ≥ 0,15 µg/ml	K	81	88,9	N	91	85,7	N-K	-3,2
	L	86	96,5	N	91	85,7	N-L	-10,8
	M	90	98,9	N	91	85,7	N-M	-13,2
Anti-PRP ≥ 1 µg/ml	K	81	33,3	N	91	28,6	N-K	-4,8
	L	86	55,8	N	91	28,6	N-L	-27,2
	M	90	74,4	N	91	28,6	N-M	-45,9
Anti-tétano ≥ 0,1 IU/ml	K	81	100,0	N	91	96,7	N-K	-3,3
	L	86	100,0	N	91	96,7	N-L	-3,3
	M	90	100,0	N	91	96,7	N-M	-3,3
Grupo K: sujetos cebados con MenC10-TT + Infanrix. hexa; Grupo L: sujetos cebados con Hib10-MenC10-TT + Infanrix. penta; Grupo M: sujetos cebados con Hib5-MenC5-TT + Infanrix. penta; Grupo N: sujetos cebados con Meningitec. + Infanrix. hexa; N: número de sujetos con resultados disponibles Se consiguieron títulos más elevados de SBA frente a MenC cebando con el tamaño más grande de MenC (grupos K, L y M) en comparación con el cebado con el conjugado de MenC-oligosacárido Meningitec.								

Memoria inmunológica (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

- 5 La administración de 1/5 dosis de la vacuna ACWY de polisacárido puro provocó un título de SBA-MenC muy elevado en los cuatro grupos privados con un 98,7-100 % y un 97,5-100 % de los sujetos cebados con un régimen de vacuna candidata representaba los ≥ 1:8 y ≥ 1:128, respectivamente. En el grupo cebado con el régimen de Meningitec™, había una tendencia para porcentaje de sujetos menor con títulos ≥ 1:128 (91,8 %). En comparación, un 17,6 % de los sujetos sin cebar presentaban títulos de SBA MenC ≥ 1:8 y ≥ 1:128.

10 **Ejemplo 4 Ensayo clínico en fase II con vacuna de conjugado de HibMenAC -TT mezclada con DTPw-HepB**

Diseño del estudio: Estudio de un solo centro, abierto, aleatorio (1:1:1:1:1), con cinco grupos. Los cinco grupos recibieron el siguiente régimen de vacunación respectivamente, a las 6, 10 y 14 semanas de edad.

- 15
- Tritanrix.-HepB/Hib-MenAC 2,5 µg/2,5 µg/2,5 µg: en lo sucesivo denominado 2,5/2,5/2,5
 - Tritanrix.-HepB/Hib-MenAC 2,5 µg/5 µg/5 µg: en lo sucesivo denominado 2,5/5/5
- 20
- Tritanrix.-HepB/Hib-MenAC 5 µg/5 µg/5 µg: en lo sucesivo denominado 5/5/5
 - Tritanrix.-HepB + Hiberix.: en lo sucesivo denominado Hiberix
 - Tritanrix.-HepB/Hiberix. + Meningitec: en lo sucesivo denominado Meningitec
- 25 Las muestras de sangre se extrajeron en el momento de la primera dosis de vacuna (Antes) y un mes después de la tercera dosis de vacuna (Después de la dosis 3).

Tritanrix es una vacuna DTPw comercializada por GlaxoSmithKline Biologicals S.A.

- 30 Se usaron 105 sujetos en cada uno de los cinco grupos proporcionando un total de 525 sujetos en el estudio.

Tabla 4 Contenido de formulaciones de vacuna GSK

Componentes por dosis (0,5 ml)	2,5/2,5/2,5*	2,5/5/5	5/5/5
Polisacárido capsular Hib PRP conjugado con toxoide del tétano (TT)	2,5 µg	2,5 µg	5 µg
Polisacárido capsular A de <i>Neisseria meningitidis</i> conjugado con TT	2,5 µg	5 µg	5 µg
Polisacárido capsular C de <i>Neisseria meningitidis</i> conjugado con TT	2,5 µg	5 µg	5 µg
* La vacuna 2,5/2,5/2,5 era una dilución de dosis de la vacuna Hib-MenAC 5/5/5 de GSK Biologicals que contiene 2,5 µg de cada uno de PRP-TT, MenA-TT y MenC-TT.			

Las formulaciones de la vacuna Hib-MenAC se mezclaron de forma extemporánea con Tritanrix-HepB. La vacuna

combinada frente a difteria-tétano-células completas de *Bordetella pertussis* - hepatitis B (DTPw-HB) de GSK Biologicals (Tritanrix-HepB) contiene no menos de 30 Unidades Internacionales (UI) de toxoide de difteria, no menos de 60 UI de toxoide del tétano, no menos de 4 UI de *Bordetella pertussis* muerta y 10 µg de antígeno de superficie de hepatitis B recombinante.

- 5 Terapia de referencia, dosis, modo de administración, número de lote:
- Programa/sitio de vacunación:* Un grupo recibió la vacuna Tritanrix.-HepB por vía intramuscular en el muslo izquierdo e Hiberix™ por vía intramuscular en el muslo derecho a las 6, 10 y 14 semanas de edad.
- 10 Otro grupo recibió la vacuna Tritanrix™ -HepB / Hiberix™ por vía intramuscular en el muslo izquierdo y la vacuna Meningitec por vía intramuscular en el muslo derecho a las 6, 10 y 14 semanas de edad.
- Vacuna/composición/dosis/número de lote:* La vacuna Tritanrix™-HepB usada fue como se ha descrito anteriormente. Una dosis (0,5 ml) de la vacuna de conjugado de tipo b de *Haemophilus influenzae* de GSK Biologicals: Hiberix™ contenía 10 µg de PRP conjugado con toxoide del tétano. En el Grupo de Hiberix™, se mezcló con diluyente estéril y el Grupo de Meningitec™ se mezcló con Tritanrix™-HepB.
- 15 Una dosis (0,5 ml) de la vacuna MENINGITEC™ de Wyeth Lederle contenía: 10 µg de oligosacárido capsular del grupo C meningocócico conjugado con 15 µg de proteína de CRM197 *Corynebacterium diphtheria* y aluminio en forma de sales.
- 20 Resultados - respuestas inmunológicas generadas frente a Hib, MenA y MenC

Tabla 5a Anti - PRP (µg/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hibertix™			Meningitec™		
	%	GMC/T	95% CL LL UL	%	GMC/T	95 % CL LL UL	%	GMC/T	95 % CL LL UL	%	GMC/T	95% CL LL UL	%	GMC/T	95% CL LL UL
% ≥ 0,15	100		96,5 100	99,0		94,8 100	100		96,5 100	100		96,5 100	100		96,5 100
GMC	20,80		15,96 27,10	22,62		17,72 28,88	19,36		15,33 24,46	38,55		29,93 49,64	10,94		8,62 13,88

Tabla 5b SBA - MenC

Grupo	2,5/2,5/2,5				2,5/5/5				5/5/5				Hibetix™				Meningitec™			
	%	GMC/T	LL	95% CL	UL	%	GMC/T	LL	95% CL	UL	%	GMC/T	LL	95% CL	UL	%	GMC/T	LL	95% CL	UL
% ≥ 1:8	99		94,7	100	100	100		96,5	100	100	100		96,5	100	100	100		96,5	100	100
GMT	3132		2497	3930		4206		3409	5189		3697		3118	4384		4501		3904	5180	

Tabla 5c SBA MenA

Grupo	2,5/2,5/2,5				2,5/5/5				5/5/5				Hibetix™				Meningitec™			
	%	GMC/T	LL	95% CL	UL	%	GMC/T	LL	95% CL	UL	%	GMC/T	LL	95% CL	UL	%	GMC/T	LL	95% CL	UL
% ≥ 1:8	99,7		91,9	99,7	99,7	100	99,7	95,8	100	100	100	96,2	100	100	100	6,8	9,1	4,0	17,1	
GMT	316,7		251,4	398,9	398,9	418,5	358,6	488,5	424,4	363	310,5	424,4	5,6	4,3	7,4	5,6	4,4	7,2		

Tabla 5d Anti -PSC (µg/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5				2,5/5/5				5/5/5				Hiberix™				Meningitec™			
	% GMC/T		95% CL		LL		UL		% GMC/T		95% CL		LL		UL		% GMC/T		95% CL	
	100	96,5	96,5	100	96,5	96,4	100	100	100	96,5	96,5	100	96,5	96,5	100	15,6	100	96,5	96,5	100
% ≥ 0,3	49,03	43,24		55,59		62,49	80,92	71,11	61,62	54,88	69,20		0,17	0,15	0,19		58,02	51,42	65,46	

Tabla 5e Anti-PSA (µg/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5				2,5/5/5				5/5/5				Hibrix™				Meningitec™			
	%	95% CL		UL	%	95 % CL		UL	%	95 % CL		UL	%	95% CL		UL	%	95% CL		UL
	GMC/T	LL			GMC/T	LL			GMC/T	LL			GMC/T	LL			GMC/T	LL		
% ≥ 0,3	100	96,4		100	100	96,5		100	99,0	94,8		100	1,0	0,0		5,4	5,9	2,2		12,5
GMC	18,10	15,34		21,35	26,51	22,93		30,79	23,40	20,05		27,30	0,15	0,15		0,15	0,17	0,15		0,18

Conclusión

Una comparación de los resultados de inmunogenicidad conseguidos usando la vacuna de conjugado de MenC-CRM197 de oligosacáridos y las tres formulaciones GSK que contienen los conjugados de polisacárido MenA-TT y MenC -TT mostraron que los conjugados de polisacárido Men fueron capaces de provocar una buena respuesta inmunogénica similar a la conseguida usando la vacuna conjugada de oligosacáridos Meningitec. Todas las formulaciones sometidas a ensayo dieron una respuesta a MenC en el 100 % de los pacientes.

Ejemplo 5 - Ensayo clínico de fase II que administra Hib MenCY de forma simultánea con Infanrix penta de acuerdo con una programación de 2, 3 y 4 meses

Diseño del estudio: un estudio multicéntrico controlado aleatorio abierto (parcialmente con doble ocultación*), de Fase II con 5 grupos que recibieron una programación primaria de tres dosis con vacunas de la siguiente manera:

Grupo Hib-MenCY 2,5/5/5: Hib-MenCY (2,5/5/5) + Infanrix™ penta Grupo Hib-MenCY 5/10/10: Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix™ penta Grupo Hib-MenCY 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix™ penta Grupo Hib-MenC: Hib-MenC (5/5) + Infanrix™ penta Grupo Menjugate: Menjugate™** + Infanrix™ hexa (control).

*Hib-MenCY 2,5/5/5, Hib-MenCY 5/10/10 y Hib-MenC se administraron con doble ocultación mientras el grupo de Hib-MenCY 5/5/5 y el grupo de Menjugate eran abiertos. Las formulaciones de 2,5/5/5, 5/10/10 y 5/5/5 de Hib-MenCY contienen polisacáridos MenC y polisacáridos MenY nativos que se microfluidizan.

**Menjugate™ contiene 10 µg de oligosacáridos MenC conjugados con 12,5-25 µg de CRM197 por dosis y la produce Chiron.

Vacunación a los +/- 2, 3, 4 meses de edad (Mes del estudio 0, Mes 1 y Mes 2), y muestras de sangre (3,5 ml) de todos los sujetos antes y un mes después de la vacunación primaria (Mes del estudio 0 y Mes 3).

Vacuna de estudio, dosis, modo de administración, número de lote: Tres dosis inyectadas por vía intramuscular a intervalos de un mes, aproximadamente a los 2, 3 y 4 meses de edad como sigue a continuación:

Tabla 6: Vacunas administradas (estudio y control), grupo, programación/sitio y dosis

Grupo	Programación (meses de edad)	Dosis de vacuna administrada en el Sitio de la parte izquierda superior del muslo	en el Sitio de la parte superior derecha del muslo
Hib-MenCY 2,5/5/5	2, 3, y 4	Hib (2,5 µg)-MenC-TT (5 µg)-MenY-TT (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenCY 5/10/10	2, 3, y 4	Hib (5 µg)-MenC-TT (10 µg)-MenY-TT (10 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenCY 5/5/5	2, 3, y 4	Hib (5 µg)-MenC-TT (5 µg)-MenY-TT (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenC	2, 3, y 4	Hib (5 µg)-Men C (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Menjugate™	2, 3, y 4	Menjugate™	DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix™ hexa)

Inmunogenicidad: Medición de los títulos/concentraciones de anticuerpos frente a cada antígeno de vacuna:

Antes de la primera dosis (Mes 0) y aproximadamente un mes después de la tercera dosis (Mes 3) en todos los sujetos para: SBA-MenC y SBA-MenY, anti-PSC y anti-PSY, anti-PRP, anti-T, anti-FHA, anti-PRN y anti-PT. Usando la actividad bactericida de suero frente a los serogrupos C y Y de *N. meningitidis* (. De corte de SBA-MenC y SBA-MenY: 1:8 y 1:128); ensayos de ELISA conjuntos de corte: $\geq 0,3$ µg/ml y ≥ 2 µg/ml para los polisacáridos de los serogrupos C y Y anti- *N. meningitidis* (IgG anti-PSC y IgG anti-PSY); $\geq 0,15$ µg/ml y $\geq 1,0$ µg/ml para polirribosil-ribitol-fosfato de polisacárido Hib (IgG anti-PRP); 5EL.U/ml para anti-FHA, anti-PRN, anti-PT; $\geq 0,1$ IU/ml anti-toxoide del tétano (anti-TT). Solo un mes después de la tercera dosis (Mes 3) en todos los sujetos para: anti-D, los anti-HB y anti-polio 1, 2 y 3. Usando ensayos de ELISA con puntos de corte: 0,1 IU/ml para anti-difteria (anti-D); ≥ 10 mIU/ml para antihepatitis B (anti-HBs); y punto de corte de ensayo de microneutralización: 1:8 para tipos de 1, 2 y 3 anti-polio (anti-polio 1, 2 y 3).

Métodos estadísticos:

Las tasas de seroprotección/seropositividad y las concentraciones/títulos de media geométrica (los GMC/GMT) con intervalos de confianza de un 95 % (95 % de CI) se calcularon por grupo, para SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY, anti-PRP, anti-Tétano, anti-PT, anti-FHA y anti-PRN antes de y un mes después de la vacunación; para anti-Difteria, anti-HBs, anti-Polio 1, anti-Polio 2 y anti-Polio 3 un mes después de la vacunación. La respuesta a la vacuna (aparición de anticuerpos en sujetos inicialmente seronegativos o al menos mantenimiento de concentraciones de anticuerpos sujetos inicialmente seropositivos) con un 95 % de CI para anti-PT, anti-PRN y anti-FHA también se calcularon un mes después de la vacunación. Las curvas acumulativas inversas para cada

anticuerpo en el Mes 3 también se presentan. Las diferencias entre los grupos Hib-MenCY y los grupos Hib- MenC, en comparación con el grupo de control de Menjugate™ se evaluaron de una manera exploratoria para cada anticuerpo, excepto para SBA-MenY y anti-PSY, en términos de (1) la diferencia entre el grupo de Menjugate™ (menos) los grupos Hib-MenCY y Hib-MenC al porcentaje de sujetos por encima de los puntos de corte especificados o con una respuesta a la vacuna con su asiento está estandarizada en un 95 % de CI, (2) las proporciones de GMC o GMT del grupo de Menjugate™ con respecto a los grupos Hib-MenCY y Hib-MenC con su 95 % de CI. Las mismas comparaciones se llevaron a cabo para evaluar la diferencia entre cada par de formulaciones de Hib-MenCY para anticuerpos anti-PRP, SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY y anti-TT.

10 Tasas de seroprotección/seropositividad y los GMC/T (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

Tabla 7a Anti - PRP (µg/ml)

Grupo	N	% ≥ 0,15	LL	UL	≥ 1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	67	100,0	94,6	100,0	98,5	92,0	100,0	9,01	7,25	11,21
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	98,5	92,0	100,0	9,49	7,72	11,65
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	98,6	92,3	100,0	8,08	6,53	9,98
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	98,6	92,7	100,0	10,44	8,49	12,83
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	80,3	69,1	88,8	2,60	1,97	3,43

Tabla 7b SBA -MenC (Título)

Grupo	N	% ≥ 1:8	LL	UL	≥ 1:128	LL	UL	GMT	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	95,7	88,0	99,1	1005,8	773,5	1308,0
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	94,0	85,4	98,3	1029,8	799,7	1326,0
Hib MenCY 5/5/5	71	100,0	94,9	100,0	94,4	86,2	98,4	906,9	691,3	1189,8
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	95,9	88,6	99,2	871,0	677,3	1120,0
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	3557,6	2978,8	4248,8

Tabla 7c Anti-PSC (µg/ml)

Grupo	N	% ≥ 0,3	LL	UL	≥ 2	LL	UL	GMT	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100,0	94,8	100,0	100,0	94,8	100,0	21,70	18,36	25,65
Hib MenCY 5/10/10	66	100,0	94,6	100,0	100,0	94,6	100,0	27,26	23,26	31,95
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	19,02	16,49	21,93
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	100,0	95,1	100,0	21,08	18,24	24,35
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	38,49	33,64	44,05

Tabla 7d SBA-MenY (Título)

Grupo	N	% ≥ 1:8	LL	UL	≥ 1:128	LL	UL	GMT	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	69	97,1	89,9	99,6	92,8	83,9	97,6	470,7	351,1	631,2
Hib MenCY 5/10/10	66	97,0	89,5	99,6	86,4	75,7	93,6	437,1	322,0	593,4,8
Hib MenCY 5/5/5	71	98,6	92,4	100,0	95,8	88,1	99,1	635,3	501,5	804,8
Hib MenC	74	21,6	12,9	32,7	13,5	6,7	23,5	9,3	6,3	13,7
Menjugate™	71	19,7	11,2	30,9	9,9	4,1	19,3	7,5	5,4	10,4

Tabla 7e Anti - PSY (µg/ml)

Grupo	N	% ≥ 0,3	LL	UL	≥ 2	LL	UL	GMT	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100,0	94,8	100,0	100,0	94,8	100,0	26,86	22,86	31,56
Hib MenCY 5/10/10	66	100,0	94,6	100,0	100,0	94,6	100,0	37,02	31,84	43,04

(continuación)

Grupo	N	% ≥ 0,3	LL	UL	≥ 2	LL	UL	GMT	LL	UL
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	23,57	19,94	27,86
Hib MenC	74	8,1	3,0	16,8	4,1	0,8	11,4	0,19	0,15	0,25
Menjugate™	71	5,6	1,6	13,8	1,4	0,0	7,6	0,17	0,15	0,19

Tabla 7f Anti-tétano (IU/ml)

Grupo	N	% ≥ 0,1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	68	100,0	94,7	100,0	3,06	2,63	3,55
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	3,25	2,88	3,68
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	2,97	2,59	3,41
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	3,15	2,73	3,64
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	1,66	1,39	1,97

Grupo Hib-MenCY 2,5/5/5: Hib-MenCY (2,5/5/5) + Infanrix™ penta**Grupo Hib-MenCY 5/10/10:** Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix™ penta**Grupo Hib-MenCY 5/5/5:** Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix™ penta**Grupo Hib-MenC:** Hib-Men (5/5) + Infanrix™ hexa**Grupo Menjugate:** Menjugate™ + Infanrix™ penta

N = número de sujetos con resultados disponibles. % = porcentaje de sujetos con concentración/título dentro del intervalo especificado

GMC/T: concentración/título medios geométricos 95 % CI = 95 % de intervalo de confianza; LL = Límite Inferior; UL = Límite Superior

5 Conclusión

Los conjugados de polisacáridos MenC y Y produjeron una buena respuesta inmunológica en todos los sujetos con un 100 % de los objetos produciendo respuestas de más de 0,3 µg/ml frente a MenC y MenY.

10 Ejemplo 6 - Ensayo clínico de fase II que compara tres formulaciones de MenACWY-TT con vacuna de conjugado de oligosacárido Meningitec MenC-CRM197

Este ejemplo informa un estudio de rango controlado de dosis controlada de fase II, abierto (parcialmente con ocultación), aleatorio, para evaluar la inmunogenicidad de tres formulaciones diferentes de vacuna de conjugado de toxoide del tétano (MenACWY-TT) de los serogrupos A, C, W-135, Y meningocócicos de GlaxoSmithKline Biological en comparación con una vacuna de conjugado de oligosacárido MenC-CRM197 (Meningitec) cuando se administra una dosis a niños con edades entre 12-14 meses.

El ensayo clínico fue un estudio multicéntrico, abierto (parcialmente con doble ocultación*), controlado en el que los sujetos idóneos de 12-14 meses de edad se clasificaron de forma aleatoria (1:1:1:1) a uno de cuatro grupos paralelos de 50 sujetos para recibir una dosis primaria única en el momento de la Visita 1 como sigue a continuación:

Forma 1T: MenACWY-TT a una dosis de 2,5 µg de polisacárido MenA conjugado con toxoide del tétano (TT), 2,5 µg de polisacárido MenC conjugado con TT, 2,5 µg de polisacárido MenW conjugado con TT y 2,5 µg de polisacárido MenY conjugado con TT.

Forma 2T: MenACWY-TT a una dosis de 5 µg de polisacárido MenA conjugado con TT, 5 µg de polisacárido MenC conjugado con TT, 5 µg de polisacárido MenW conjugado con TT y 5 µg de polisacárido MenY conjugado con TT.

Forma 3T: MenACWY-TT a una dosis de 2,5 µg de polisacárido MenA conjugado con TT, 10 µg de polisacárido MenC conjugado con TT, 2,5 µg de polisacárido MenW conjugado con TT y 2,5 µg de polisacárido MenY conjugado con TT.

Ctrl T: 10 µg de oligosacárido MenC conjugado con 12,5-25 µg de CRM197 (Meningitec™).

* Las tres formulaciones de MenACWY-TT diferentes se administraron de una manera con doble ocultación.

Programación/sitio de vacunación: Una sola dosis de vacuna se administra por vía intramuscular en el deltoides izquierdo en el momento de la maestra inicia visita 1 (Mes del Estudio 0) de acuerdo con la asignación aleatoria. Todas las vacunas candidatas se suministraron como un gránulo liofilizado en un vial de monodosis (0,5 ml después de su reconstitución con el diluyente suministrado de solución salina).

Inmunogenicidad: Medición de títulos/concentraciones de anticuerpos frente a componentes de antígeno de vacuna meningocócica en muestras de sangre obtenidas antes de la dosis de vacuna del estudio (Mes 0) y aproximadamente un mes después de la dosis de vacuna del estudio (Mes 1) en todos los sujetos. La determinación de los títulos de anticuerpo bactericida frente a los serogrupos A, C, W-135 y Y (SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW y SBA-MenY) de *N. meningitidis* mediante un ensayo bactericida (puntos de corte del ensayo: una dilución de 1:8 y

1:128) y medición de anticuerpos con ELISA frente a los serogrupos A, C, W-135 y Y (anti-PSA, anti-PSC, anti-PSW y anti-PSY, puntos de corte del ensayo $\geq 0,3 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 2 \mu\text{g/ml}$) de *N. meningitidis*, y toxoide del tétano (antitetánico, punto de corte del ensayo 0,1 IU/ml).

5 Resultados

La respuesta al anticuerpo en términos del porcentaje de individuos sensibles a SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW y SBA-MenY un mes después de la vacunación (el punto final primario) se muestra en la Tabla 8. Una respuesta se define como mayor o igual que un aumento de 4 veces para sujetos seropositivos o seroconversión para sujetos seronegativos antes de la vacunación.

Tabla 8: Respuestas a la vacuna para anticuerpo SBA un mes después de la vacunación

Anticuerpo	Grupo	N	%	LL	UL
SBA-MenA	Forma 1T	42	61,9	45,6	76,4
	Forma 2T	39	82,1	66,5	92,5
	Forma 3T	40	62,5	45,8	77,3
	Meningitec™	36	11,1	3,1	26,1
SBA-MenC	Forma 1T	46	97,8	88,5	99,9
	Forma 2T	43	100,0	91,8	100,0
	Forma 3T	44	95,5	84,5	99,4
	Meningitec™	49	91,8	80,4	97,7
SBA-MenW	Forma 1T	45	100,0	92,1	100,0
	Forma 2T	43	97,7	87,7	99,9
	Forma 3T	45	100,0	92,1	100,0
	Meningitec™	46	15,2	6,3	28,9
SBA-MenY	Forma 1T	47	97,9	88,7	99,9
	Forma 2T	44	88,6	75,4	96,2
	Forma 3T	45	93,3	81,7	98,6
	Meningitec™	49	4,1	0,5	14,0

La Tabla 9 muestran los números de sujetos que consiguen títulos de SBA superiores a los puntos de corte de 1:8 y 1:128 así como los GMT.

Tabla 9: Tasas seropositivas y los GMT para anticuerpos SBA un mes después de la vacunación

	Grupo	N	%	$\geq 1:8$ LL	UL	%	$\geq 1:128$ LL	UL	GMT
SBA-MenA	Forma 1T	46	100	92,3	100	100	92,3	100	1457,3
	Forma 2T	45	100	92,1	100	97,8	88,2	99,9	1776,9
	Forma 3T	48	97,9	88,9	99,9	97,9	88,9	99,9	1339,5
	Meningitec™	41	51,2	35,1	67,1	43,9	28,5	60,3	42,8
SBA-MenC	Forma 1T	47	97,9	88,7	99,9	78,7	64,3	89,3	281,3
	Forma 2T	45	100	92,1	100	84,4	70,5	93,5	428,6
	Forma 3T	47	95,7	85,5	99,5	85,1	71,7	93,8	478,4
	Meningitec™	50	94,0	83,5	98,7	62,0	47,2	75,3	200,1
SBA-Men W	Forma 1T	47	100	92,5	100	100	92,5	100	2529,1
	Forma 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	2501,6
	Forma 3T	48	100	92,6	100	97,9	88,9	99,9	2300,2
	Meningitec™	48	27,1	15,3	41,8	6,3	1,3	17,2	9,4
SBA-MenY	Forma 1T	47	100	92,5	100	100	92,5	100	1987,4
	Forma 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	2464,8
	Forma 3T	48	100	92,6	100	97,9	88,9	99,9	2033,7
	Meningitec™	49	49,0	34,4	63,7	28,6	16,6	43,3	25,0

La vacunación con las formulaciones del conjugado de polisacárido ACWY-TT condujo a buenas respuestas de SBA frente a MenA, MenC, MenW y MenY con un 95-100 % de los sujetos con títulos superiores a 1:8. En particular, las formulaciones de 5/5/5/5 y 2,5/10/2,5/2,5 de los conjugados de polisacárido produjeron una respuesta más elevada frente a MenC que la vacuna Meningitic de oligosacárido en una proporción más elevada de sujetos con títulos superior a 1:128 y las lecturas de GMT.

Tabla 10 Tasas de seropositividad y los GMC para anticuerpos anti polisacárido un mes después de la vacunación

	Grupo	N	%	$\geq 0,3 \mu\text{g/ml}$ LL	UL	%	$\geq 2 \mu\text{g/ml}$ LL	UL	GMC mg/ml
Anti-MenA	Forma 1T	47	93,6	82,5	98,7	68,1	52,9	80,9	2,35
	Forma 2T	45	100	92,1	100	64,4	48,8	78,1	3,11
	Forma 3T	48	95,8	85,7	99,5	37,5	24,0	52,6	1,65
	Meningitec™	50	10,0	3,3	21,8	2,0	0,1	10,6	0,18
Anti-MenC	Forma 1T	47	100	92,5	100	100	92,5	100	9,57

(continuación)

	Grupo	N	%	≥ 0,3 µg/ml LL	UL	%	≥ 2 µg/ml LL	UL	GMC mg/ml
	Forma 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	12,53
	Forma 3T	47	100	92,5	100	97,9	88,7	99,9	19,29
	Meningitec™	49	98,0	89,1	99,9	93,9	83,1	98,7	7,95
Anti-MenW	Forma 1T	47	100	92,5	100	80,9	66,7	90,9	4,56
	Forma 2T	45	100	92,1	100	93,3	81,7	98,6	6,83
	Forma 3T	48	93,8	82,8	98,7	72,9	58,2	84,7	2,88
	Meningitec™	50	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0	7,1	0,15
Anti-MenY	Forma 1T	47	100	92,5	100	97,9	88,7	99,9	8,90
	Forma 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	12,78
	Forma 3T	47	97,9	88,7	99,9	87,2	74,3	95,2	5,67
	Meningitec™	50	2,0	0,1	10,6	0,0	0,0	7,1	0,15

Las tres formulaciones de vacuna de conjugado de polisacárido ACWY-TT produjeron buenas respuestas inmunológicas frente a MenA, MenC, MenW y MenY con entre un 93 % y un 100 % de los sujetos consiguiendo títulos superiores a 0,3 µg/ml. Las lecturas de GMC más elevada se consiguieron usando las poblaciones de 5/5/5/5 y 2/5/10/2,5/2,5 de la vacuna de conjugado de polisacárido ACWY-TT en comparación con Meningitec™.

Ejemplo 7 – comparación de la inmunogenicidad de conjugados de polisacárido MenY nativo y dimensionado

Los ratones (DBA/2 hembra de 6-8 semanas) recibieron dos inyecciones, con una separación de 2 semanas, de PSY-TT por vía subcutánea. Las muestras de sangre se extrajeron 14 días después de la segunda inyección con el fin de llevar a cabo un ELISA anti-PSY y SBA usando la cepa S1975 menY. Por inyección, los ratones recibieron 1 µg de PSY-TT (formulación sin ads. lio.).

Se usaron los conjugados que se describen en la tabla 11.

Tabla 11

Conjugados	ENYTT012	ENYTT014	ENYTT015 bis
Microfluidización de PSY	NO	Si (40 ciclos)	Si (20 ciclos)
TT/PS ratio	1/1	1/1	1/1

Resultados

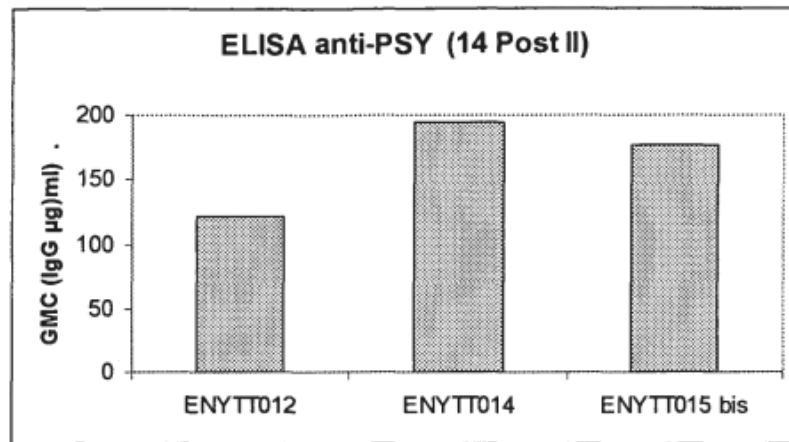
Los resultados (Figura 1) muestran una tendencia hacia una inmunogenicidad más elevada para conjugados preparados usando el PSY dimensionado. La Figura 1A muestra los resultados de GMC obtenidos en un ensayo ELISA para antisueros proporcionados frente a conjugados preparados a partir de MenY nativo(ENYTT012), MenY microfluidizado - 40 ciclos (ENYTT014) y MenY microfluidizado - 20 ciclos (ENYTT015 bis). Los GMC más elevados se obtuvieron cuando el MenY-TT se preparó a partir de MenY microfluidizado.

Se obtuvieron resultados similares cuando los antisueros se evaluaron con el ensayo SBA (Figura 1B). De nuevo los valores de GMT más elevado se consiguieron usando conjugados preparados a partir de MenY microfluidizado.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que no usa ningún adyuvante de sal de aluminio o no usa ningún adyuvante, comprendiendo la composición polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno de los serogrupos A, C, W135 e Y conjugados con una proteína vehículo para producir un conjugado de polisacárido capsular de *N. meningitidis*, en el que el tamaño promedio de cada polisacárido de *N. meningitidis* es superior a 50 kDa, en el que cada polisacárido de *N. meningitidis* se conjugó con el vehículo de toxoide del tétano y es un polisacárido nativo o se dimensiona por microfluidización, en el que dicha composición comprende un polisacárido capsular MenC conjugado con toxoide del tétano y dicho polisacárido capsular MenC tiene un tamaño promedio de 150-210 kDa.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 que además comprende un polisacárido capsular MenA conjugado con toxoide del tétano.
3. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que dicho polisacárido capsular MenC tiene un tamaño promedio de 150-180 kDa.
4. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que además comprende un polisacárido capsular MenY conjugado con toxoide del tétano.
5. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que además comprende un polisacárido capsular MenW conjugado con toxoide del tétano.
6. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente en la que cada polisacárido capsular de *N. meningitidis* tiene una proporción de polisacárido:vehículo de 1:5-5:1 o 1:1-1:4 (p/p).
7. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente que además comprende un polisacárido capsular b de *H. influenzae* conjugado con una proteína vehículo.
8. La composición inmunogénica de la reivindicación 7 en la que el polisacárido capsular b de *H. influenzae* está conjugado con una proteína vehículo seleccionada entre el grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT y proteína D.
9. La composición inmunogénica de la reivindicación 7 u 8 en la que la proporción de Hib con respecto a proteína vehículo en el conjugado de sacárido capsular Hib está entre 1:5 y 5:1 (p/p) o entre 1:1 y 1:4, 1:2 y 1:3,5 o es aproximadamente 1:3 (p/p).
10. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende una preparación de vesícula de membrana externa o sacárido capsular del serogrupo B de *N. meningitidis*.
11. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Un kit de vacuna para administración simultánea o secuencial que comprende dos composiciones inmunogénicas multivalentes para proporcionar protección en un hospedador frente a una enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, comprendiendo dicho kit un primer recipiente que comprende:
 - toxoides del tétano (TT),
 - toxoides de difteria (DT), y
 - componentes de células completas o acelulares de pertussis
 y un segundo recipiente que comprende:
 - la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
13. Un proceso para preparar la vacuna de la reivindicación 11 que comprende la etapa de mezclar la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad causada por infección por *Neisseria meningitidis*.

A



B

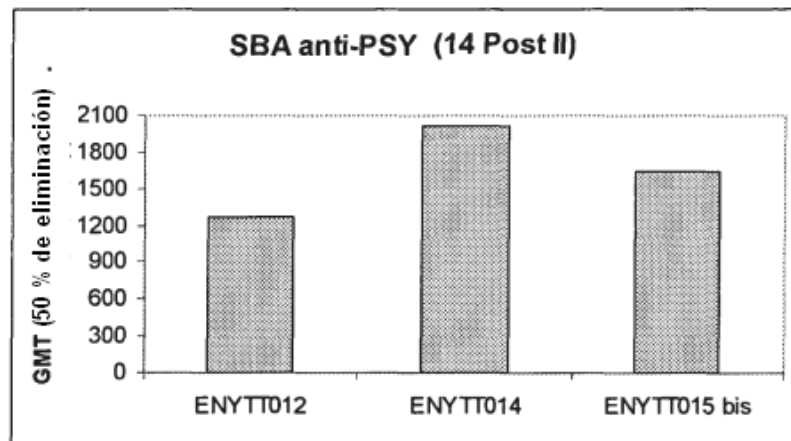


Figura 1