

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 471**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2011 PCT/US2011/050436**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12031271**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2011 E 11758029 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2612148**

54 Título: **Ensayos de anticuerpos bactericidas para evaluar la inmunogenia y la potencia de vacunas de sacárido capsular meningocócico**

30 Prioridad:

04.09.2010 US 380220 P

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

25.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BALOCCHI, CRISTIANA;
LUZZI, ENRICO;
PALUDI, MARILENA;
GIULIANI, MARZIA, MONICA;
DONNELLY, JOHN y
MORI, ELENA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 744 471 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

Ensayos de anticuerpos bactericidas para evaluar la inmunogenia y la potencia de vacunas de sacárido capsular meningocócico

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de los ensayos para evaluar la potencia de vacunas de sacárido capsular meningocócico. En determinadas realizaciones, la presente divulgación se refiere al uso de la unión de anticuerpos bactericidas como un indicador para evaluar la inmunogenia, la potencia o ambas, en lugar de inmunizar un modelo animal o simplemente evaluar características físicas tales como la longitud del sacárido.

Antecedentes

- 10 *Neisseria meningitidis* (meningococo) es un patógeno humano gramnegativo. Coloniza la faringe, provocando meningitis y, ocasionalmente, septicemia en ausencia de meningitis. Está estrechamente relacionado con *N. gonorrhoeae*, aunque una característica que diferencia claramente al meningococo es la presencia de una cápsula polisacáridica que está presente en todos los meningococos patógenos.

- 15 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 grupo A es el patógeno más frecuentemente implicado en la enfermedad epidémica en el África subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la gran mayoría de los casos en los EE.UU. y en la mayoría de los países desarrollados. Los serogrupos W135 e Y son responsables del resto de los casos en los EE.UU. y los países desarrollados.

- 20 Se conoce desde hace muchos años una vacuna tetravalente de polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, Y y W135, y se ha autorizado para su uso humano. Aunque es eficaz en adolescentes y adultos, induce una respuesta inmunitaria deficiente y una protección de corta duración y no puede usarse en lactantes. Esto se debe a que los polisacáridos son antígenos independientes de linfocitos T que inducen una respuesta inmunitaria débil que no puede reforzarse. Los polisacáridos en esta vacuna no están conjugados y están presentes en una relación 1:1:1:1. MENCEVAX ACWY(TM) contiene 50 µg de cada polisacárido purificado una vez reconstituido a partir de su forma liofilizada.

Las vacunas conjugadas contra el serogrupo C se han aprobado para su uso humano e incluyen MENJUGATE(TM), MENINGITEC(TM) y NEISVAC-C(TM). Las mezclas de conjugados de los serogrupos A+C+W135+Y también se han aprobado para su uso humano e incluyen MENVEO(TM) y MENACTRA(TM).

- 30 Moe y col. (2002), *Infection and Immunity*, vol. 70, n.º 11: p. 6021-6031 describe procedimientos de evaluación de la cantidad de polisacárido capsular en diferentes vacunas de vesículas de *N. meningitidis* mediante ELISA competitivo. Tsang y col. (2005), *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 12, n.º 1, p. 152-156 describe la evaluación de anticuerpos monoclonales contra los serogrupos de *N. meningitidis* B, C, Y y W135 como agentes de seroagrupamiento mediante ELISA indirecto. El documento WO2006/034320 A2 se refiere en general a evaluar el carácter antigénico de una vacuna conjugada multivalente mediante la unión a anticuerpo específico de serogrupo antipolisacárido usando un procedimiento ELISA de doble sándwich y midiendo la inmunogenia de la vacuna conjugada multivalente en un modelo animal. Rosenqvist y col. (1990), *APMIS* 98: p. 501-506 describe la determinación del serogrupo de *N. meningitidis* por ELISA de células completas, transferencia puntuales y aglutinación.

- 40 Con la proliferación de vacunas de sacárido capsular meningocócico, existe la necesidad de procedimientos de evaluación de la inmunogenia, la potencia o ambas, de cada lote de vacuna después de la fabricación para garantizar que cada lote produzca la respuesta inmunitaria esperada sin tener que inmunizar un animal de ensayo con una muestra de cada lote o depender de la mera caracterización física de los componentes del sacárido capsular. Cualquiera de estos procedimientos debe cumplir con los estrictos requisitos reguladores gubernamentales para la autorización de una vacuna establecidos por agencias tales como la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. (FDA) en los Estados Unidos y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en Europa. Por tanto, los equivalentes para inmunogenia, potencia o ambas que pueden funcionar en un laboratorio no necesariamente cumplirán con los requisitos de las agencias reguladoras dado que la vacuna se administrará a un sujeto humano. Por tanto, es un objeto de la invención proporcionar procedimientos para evaluar la inmunogenia, la potencia o ambas, de vacunas de sacárido capsular meningocócico que cumplan con los criterios exigentes de las agencias reguladoras gubernamentales midiendo de la unión a un anticuerpo bactericida específico para el sacárido capsular.

Sumario

La invención es como se define en las reivindicaciones. La divulgación proporciona composiciones, procedimientos y kits para evaluar la inmunogenia, la potencia o ambas, de vacunas de sacárido capsular meningocócico.

- 55 La invención proporciona un procedimiento de evaluación de la potencia de una vacuna de sacárido capsular meningocócico que comprende: (a) poner en contacto la vacuna de sacárido capsular meningocócico con un anticuerpo bactericida y un sacárido de control, en el que la vacuna de sacárido capsular meningocócico compite con

el sacárido de control por la unión al anticuerpo bactericida; (b) evaluar la potencia de la vacuna de sacárido capsular meningocócico midiendo de la unión del anticuerpo bactericida al sacárido de control; en el que la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende al menos dos sacáridos seleccionados entre (i) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo A que es un homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato con unión ($\alpha 1 \rightarrow 6$), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4, (ii) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C que es un homopolímero de ácido siálico con unión ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (ácido N-acetil neuramínico ("NeuNAc"), (iii) un sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 que es un polímero de unidades disacarídicas de ácido siálico-galactosa escrito como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Gal- α -($1 \rightarrow$, y (iv) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y que es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto porque la unidad de repetición disacarídica incluye glucosa en lugar de galactosa y la estructura del serogrupo Y se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Glc- α -($1 \rightarrow$, y en el que el anticuerpo bactericida se une a uno de los al menos dos sacáridos y al sacárido de control, y en el que la potencia se evalúa comparando la curva de inhibición con una curva de inhibición de referencia para un sacárido capsular de referencia del mismo serogrupo de potencia conocida.

La invención también proporciona un kit para evaluar la potencia de una vacuna de sacárido capsular meningocócico que comprende: (a) una placa de pocillos múltiples; (b) sacáridos de control para unirse a una superficie de los pocillos, sacáridos de control que son sacáridos capsulares de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 e Y, y que están en forma de polisacáridos capsulares nativos obtenidos de una bacteria meningocócica del serogrupo requisito, oligosacáridos capsulares, sacáridos sintéticos o conjugados de cualquiera de los anteriores; y (c) anticuerpos bactericidas, cada uno de los cuales se une a uno de los sacáridos de control y uno de los sacáridos capsulares en la vacuna, en el que la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende (i) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo A que es un homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato con unión ($\alpha 1 \rightarrow 6$), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4, (ii) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C que es un homopolímero de ácido siálico con unión ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (ácido N-acetil neuramínico ("NeuNAc"), (iii) un sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 que es un polímero de unidades disacarídicas de ácido siálico-galactosa escrito como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Gal- α -($1 \rightarrow$, y (iv) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y que es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto porque la unidad de repetición disacarídica incluye glucosa en lugar de galactosa y la estructura del serogrupo Y se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Glc- α -($1 \rightarrow$, y en el que los sacáridos de control competirán con la vacuna por la unión al anticuerpo bactericida.

Otro aspecto de la divulgación incluye procedimientos de evaluación de la potencia de una vacuna de sacárido capsular meningocócico para la autorización regulatoria, incluyendo poner en contacto la vacuna de sacárido capsular meningocócico con un anticuerpo bactericida y, opcionalmente, un sacárido de control; evaluación de la potencia de la vacuna de sacárido capsular meningocócico midiendo la unión del anticuerpo bactericida a la vacuna de sacárido capsular meningocócico u opcionalmente al sacárido de control; y autorización de la vacuna de sacárido capsular meningocócico si la potencia cumple con los requisitos reguladores para la autorización, en los que la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende al menos dos sacáridos seleccionados entre (i) un sacárido capsular de serogrupo A de *N. meningitidis*, (ii) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C, (iii) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo W y (iv) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y, y donde el anticuerpo bactericida se une a uno de los al menos dos sacáridos y, opcionalmente, al sacárido de control. En una realización, los requisitos de autorización regulatoria comprenden un requisito de potencia mínima y un requisito de fiabilidad de medición donde el requisito de fiabilidad de medición puede ser un coeficiente de variación de las mediciones que sea inferior a un valor máximo tal como del 15 % para el coeficiente de variación de repetibilidad (todos los antígenos). En otra realización que puede combinarse con la realización anterior, los requisitos reguladores son determinados por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. o la Agencia Europea del Medicamento. En determinadas realizaciones que pueden combinarse con las realizaciones anteriores, los al menos dos sacáridos son (i) y (ii); son (ii) y (iv); o son los cuatro sacáridos (i)-(iv). En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, los al menos dos sacáridos se conjugan con una proteína transportadora. En otra realización, la proteína transportadora puede ser: toxoide diftérico; toxoide tetánico; CRM197; proteína D de *H. influenzae* o una combinación de lo anterior. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la vacuna de sacárido capsular meningocócico se formula para inyección intramuscular. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende adicionalmente un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la vacuna de sacárido capsular meningocócico no incluye ningún material mercurial. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende adicionalmente uno o más de los siguientes antígenos adicionales: (i) un sacárido capsular conjugado de *Haemophilus influenzae* de tipo B; (ii) un sacárido capsular conjugado de *Streptococcus pneumoniae*; (iii) un antígeno proteínico de *N. meningitidis* serogrupo B; (iv) un antígeno diftérico; (v) un antígeno tetánico; (vi) un antígeno pertúsico celular o de célula completa; (vii) uno o más antígenos pertúsicos acelulares; (viii) un antígeno del virus de la hepatitis B; (ix) uno o más antígenos de poliovirus; y (x) un antígeno del virus de la hepatitis A. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende adicionalmente un alcohol de azúcar o sacarosa. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, se incluye el sacárido de control opcional, se mide la unión del anticuerpo bactericida al sacárido de control y la vacuna de sacárido capsular meningocócico compete con el sacárido de control para unirse al anticuerpo bactericida. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, incluyendo el sacárido de control, en la que el

5 sacárido de control se selecciona entre el grupo que consiste en: un polisacárido capsular nativo del mismo serogrupo que uno de los al menos dos sacáridos, un oligosacárido capsular del mismo serogrupo que uno de los al menos dos sacáridos, un sacárido sintético, un conjugado de cualquiera de los anteriores o una combinación de uno o más de los anteriores. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, incluyendo el
10 sacárido de control, la medición de la unión incluye la adición de un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo bactericida en el que el anticuerpo secundario se conjuga con una enzima que cataliza una reacción detectable tal como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano picante. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, incluyendo el sacárido de control, la medición de la unión incluye diluir en serie la vacuna de sacárido capsular meningocócico. En otra realización, la dilución en serie incluye al menos uno, al menos
15 dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco puntos en una porción lineal de una curva de inhibición calculada con mediciones de la dilución en serie. En otra realización, la potencia se evalúa comparando la curva de inhibición con una curva de inhibición de referencia para un sacárido capsular de referencia del mismo serogrupo de potencia conocida. En otra realización, la comparación se realiza tomando el logaritmo antinatural de la diferencia entre la intersección de la curva de inhibición de referencia para el sacárido capsular de referencia y la intersección de la curva de inhibición para la vacuna de sacárido capsular meningocócico dividida por la pendiente común. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores que incluyen una dilución en serie, la dilución en serie es en una placa de pocillos múltiples tal como una placa de microtitulación de 96 pocillos o una placa de microtitulación de 384 pocillos. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores que incluyen el sacárido de control y una placa de pocillos múltiples, el sacárido de control se une a una superficie de al menos un pocillo de la placa de pocillos múltiples. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores que incluyen una dilución en serie, en la que la dilución en serie es una serie de diluciones con factor de dilución 2 o 3 si el sacárido de control es de los serogrupos C, Y o W, o una serie de diluciones con factor de dilución 5 si el sacárido de control es del serogrupo A.

25 Otro aspecto más de la divulgación incluye procedimientos más generales para evaluar la potencia de una vacuna de sacárido capsular meningocócico que comprende poner en contacto la vacuna de sacárido capsular meningocócico con un anticuerpo bactericida y opcionalmente un sacárido de control; y evaluar la potencia de la vacuna de sacárido capsular meningocócico midiendo la unión del anticuerpo bactericida a la vacuna de sacárido capsular meningocócico u opcionalmente al sacárido de control, en los que la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende al menos dos sacáridos seleccionados entre (i) un sacárido capsular de serogrupo A de N. meningitidis, (ii) un sacárido capsular de N. meningitidis serogrupo C, (iii) un sacárido capsular de N. meningitidis serogrupo W y (iv) un sacárido capsular de N. meningitidis serogrupo Y, y donde el anticuerpo bactericida se une a uno de los al menos dos sacáridos y, opcionalmente, al sacárido de control. En determinadas realizaciones, los al menos dos sacáridos son (i) y (ii); son (ii) y (iv); o incluyen los cuatro sacáridos (i)-(iv). En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, los al menos dos sacáridos se conjugan con una proteína transportadora. En otra realización,
35 la proteína transportadora puede ser: toxoide diftérico; toxoide tetánico; CRM197; proteína D de H. influenzae o una combinación de lo anterior. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la vacuna de sacárido capsular meningocócico se formula para inyección intramuscular. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende adicionalmente un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la vacuna de sacárido capsular meningocócico no incluye ningún material mercurial. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende adicionalmente uno o más de los siguientes antígenos adicionales: (i) un sacárido capsular conjugado de Haemophilus influenzae de tipo B; (ii) un sacárido capsular conjugado de Streptococcus pneumoniae; (iii) un antígeno proteínico de N. meningitidis serogrupo B; (iv) un antígeno diftérico; (v) un antígeno tetánico; (vi) un antígeno pertúsico celular o de célula completa; (vii) uno o más antígenos pertúsicos acelulares; (viii) un antígeno del virus de la hepatitis B; (ix) uno o más antígenos de poliovirus; y (x) un antígeno del virus de la hepatitis A. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende adicionalmente un alcohol de azúcar o sacarosa. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, se incluye el sacárido de control opcional, se mide la unión del anticuerpo bactericida al sacárido de control y la vacuna de sacárido capsular meningocócico compete con el sacárido de control para unirse al anticuerpo bactericida. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, incluyendo el sacárido de control, en la que el sacárido de control se selecciona entre el grupo que consiste en: un polisacárido capsular nativo del mismo serogrupo que uno de los al menos dos sacáridos, un oligosacárido capsular del mismo serogrupo que uno de los al menos dos sacáridos, un sacárido sintético, un conjugado de cualquiera de los anteriores o una combinación de uno o más de los anteriores. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, incluyendo el sacárido de control, la medición de la unión incluye la adición de un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo bactericida en el que el anticuerpo secundario se conjuga con una enzima que cataliza una reacción detectable tal como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano picante. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, incluyendo el sacárido de control, la medición de la unión incluye diluir en serie la vacuna de sacárido capsular meningocócico. En otra realización, la dilución en serie incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco puntos en una porción lineal de una curva de inhibición calculada con mediciones de la dilución en serie. En otra realización, la potencia se evalúa comparando la curva de inhibición con una curva de inhibición de referencia para un sacárido capsular de referencia del mismo serogrupo de potencia conocida. En otra realización, la comparación se realiza tomando el anti-logaritmo de la diferencia entre la intersección
65

de la curva de inhibición de referencia para el sacárido capsular de referencia y intersección de la curva de inhibición para la vacuna de sacárido capsular meningocócico dividida por la pendiente común. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores que incluyen una dilución en serie, la dilución en serie es en una placa de pocillos múltiples tal como una placa de microtitulación de 96 pocillos o una placa de microtitulación de 384 pocillos. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores que incluyen el sacárido de control y una placa de pocillos múltiples, el sacárido de control se une a una superficie de al menos un pocillo de la placa de pocillos múltiples. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores que incluyen una dilución en serie, en la que la dilución en serie es una serie de diluciones con factor de dilución 2 o 3 si el sacárido de control es de los serogrupos C, Y o W, o una serie de diluciones con factor de dilución 5 si el sacárido de control es del serogrupo A.

Otro aspecto más de la divulgación incluye un kit para evaluar la potencia de una vacuna de sacárido capsular meningocócico para autorización que incluye una placa de pocillos múltiples; un sacárido de control para unirse a una superficie de al menos uno de los pocillos; y un anticuerpo bactericida, en los que la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende al menos dos sacáridos seleccionados entre (i) un sacárido capsular de serogrupo A de N. meningitidis, (ii) un sacárido capsular de N. meningitidis serogrupo C, (iii) un sacárido capsular de N. meningitidis serogrupo W y (iv) un sacárido capsular de N. meningitidis serogrupo Y, y donde la muestra de anticuerpo bactericida se une a uno de los al menos dos sacáridos y el sacárido de control. En una realización, los kits pueden incluir adicionalmente un tampón de dilución de anticuerpos bactericidas, en el que el tampón de dilución de anticuerpos bactericidas incluye opcionalmente un detergente (por ejemplo, TWEEN 20 (TM)). En otra realización que puede combinarse con la realización anterior, los kits también incluyen un tampón de dilución de vacuna. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el sacárido de control puede ser un polisacárido capsular nativo del mismo serogrupo como uno de los al menos dos sacáridos, un oligosacárido capsular del mismo serogrupo que uno de los al menos dos sacáridos, un sacárido sintético o un conjugado de cualquiera de los anteriores. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el sacárido de control es el polisacárido capsular nativo. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo bactericida se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un tampón que incluye una proteína de albúmina sérica. En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el kit comprende un anticuerpo bactericida específico y un sacárido de control para cada uno de los al menos dos sacáridos en la vacuna de sacárido capsular meningocócico.

Sumario de los dibujos

Las **FIG. 1A-1H** muestran una comparación de curvas de inhibición obtenidas con un control negativo (triángulos) y un patrón de referencia (la vacuna Menveo - cuadrados) con anticuerpos monoclonales bactericidas en placas revestidas con polisacárido nativo (panel A), (panel C), (panel E) y (panel G) y con conjugados oligosacárido-CRM₁₉₇ (panel B), (panel D), (panel F) y (panel H).

Las **FIG. 2A-2F** muestran el gráfico lineal MenA de logDO frente a la concentración logarítmica para las seis placas (los círculos identifican puntos excluidos del análisis de regresión lineal debido a que están fuera del intervalo lineal, mientras que los puntos continuos son los puntos incluidos en el análisis).

Las **FIG. 3A-3F** muestran el gráfico lineal MenC de logDO frente a la concentración logarítmica para las seis placas (los círculos identifican puntos excluidos del análisis de regresión lineal debido a que están fuera del intervalo lineal, mientras que los puntos continuos son los puntos incluidos en el análisis).

Las **FIG. 4A-4F** muestran el gráfico lineal MenW135 de logDO frente a la concentración logarítmica para las seis placas (los círculos identifican puntos excluidos del análisis de regresión lineal debido a que están fuera del intervalo lineal, mientras que los puntos continuos son los puntos incluidos en el análisis).

Las **FIG. 5A-5F** muestran el gráfico lineal MenY de logDO frente a la concentración logarítmica para las seis placas (los círculos identifican puntos excluidos del análisis de regresión lineal debido a que están fuera del intervalo lineal, mientras que los puntos continuos son los puntos incluidos en el análisis).

Las **FIG. 6A-6D** muestran la comparación entre la curva patrón (diamantes de color gris oscuro) y controles negativos para los antígenos MenA, C, W135 e Y ("vacuna de ensayo" - círculos de color gris claro). El panel (A) muestra el gráfico de logDO frente a la concentración logarítmica para MenA. El panel (B) muestra el gráfico de logDO frente a la concentración logarítmica para MenC. El panel (C) muestra el gráfico de logDO frente a la concentración logarítmica para MenW135. El panel (D) muestra el gráfico de logDO frente a la concentración logarítmica para MenY.

Las **FIG. 7A-7B**: El panel (A) muestra el gráfico de logDO frente a la concentración logarítmica para mAb anti MenW135 inhibido por la vacuna patrón (círculos de color gris claro) y el conj oligoW-CRM (triángulo de color gris oscuro); Valor $p = 0,66$. El panel (B) muestra el gráfico de logDO frente a la concentración logarítmica para mAb anti MenW-135 inhibido por la vacuna patrón (círculos de color gris claro) y el conj oligoC-CRM (triángulos de color gris oscuro); Valor $p = 0,00$.

Las **FIG. 8A-8D**: perfiles de RMN ¹H de muestras de conjugado CRM₁₉₇-MenA (Panel A), -MenC (Panel B), -

MenW₁₃₅ (Panel C) y -MenY (Panel D) antes (línea de puntos) y después de la des-O-acetilación (línea continua).

FIG. 9: Gel de SDS-Page teñido con Coomassie (acetato de Tris al 7 %) de CRM₁₉₇-MenA (Línea 1: Material de partida, Línea 2: Retenido de 30 kDa, Línea 3: Permeado de 30 kDa) y CRM₁₉₇-MenC (Línea 4: Material de partida, Línea 5: Retenido de 30 kDa, Línea 6: Permeado de 30 kDa).

5 **FIG. 10:** Gel de SDS-Page teñido con Coomassie (acetato de tris al 7 %) de CRM₁₉₇-MenW135 (Línea 1: Material de partida, Línea 2: Retenido de 30 kDa, Línea 3: Permeado de 30 kDa) y CRM₁₉₇-MenY (Línea 4: Material de partida, Línea 5: Retenido de 30 kDa, Línea 6: Permeado de 30 kDa).

10 **FIG. 11:** Valores de potencia de las tres réplicas para cada muestra diferente (lote en volumen de MenA-CRM₁₉₇ monovalente GFB001A con adición de diferentes % de sacáridos libres combinado con lotes en volumen monovalentes de MenC-CRM₁₉₇, MenW135-CRM₁₉₇ y MenY-CRM₁₉₇) para el antígeno MenA. También se muestran el valor medio, la desviación típica y el valor de corte más bajo. Los valores en cursiva indican placas no válidas.

15 **FIG. 12:** Valores de potencia de las tres réplicas para cada muestra diferente (lote en volumen de MenC-CRM₁₉₇ monovalente TRMENC01 con adición de diferentes % de sacáridos libres combinado con lotes en volumen monovalentes de MenA-CRM₁₉₇, MenW135-CRM₁₉₇ y MenY-CRM₁₉₇) para el antígeno MenC. También se muestran el valor medio, la desviación típica y el valor de corte más bajo. Los valores en cursiva indican placas no válidas.

20 **FIG. 13:** Valores de potencia de las tres réplicas para cada muestra diferente (lote en volumen de MenW135-CRM₁₉₇ monovalente GFB007W con adición de diferentes % de sacáridos libres combinado con lotes en volumen monovalentes de MenA-CRM₁₉₇, MenC-CRM₁₉₇ y MenY-CRM₁₉₇) para el antígeno MenW135. También se muestran el valor medio, la desviación típica y el valor de corte más bajo. Los valores en cursiva indican placas no válidas.

25 **FIG. 14:** Valores de potencia de las tres réplicas para cada muestra diferente (lote en volumen de MenY-CRM₁₉₇ monovalente GFB008Y con adición de diferentes % de sacáridos libres combinado con lotes en volumen monovalentes de MenA-CRM₁₉₇, MenC-CRM₁₉₇ y Men W135-CRM₁₉₇) para el antígeno MenY. También se muestran el valor medio, la desviación típica y el valor de corte más bajo. Los valores en cursiva indican placas no válidas.

FIG. 15: Valores de potencia de las tres réplicas para las muestras des-O-acetiladas de MenA, MenC, MenW135 y MenY. También se muestran el valor medio y la desviación típica.

30 **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

La divulgación proporciona procedimientos, composiciones y kits para evaluar la inmunogenia, la potencia o ambas, de vacunas de polisacárido capsular meningocócico. Los procedimientos, composiciones y kits desvelados se basan en un ensayo por el cual un anticuerpo bactericida que se une al polisacárido de la vacuna puede usarse como un indicador preciso de la inmunogenia, la potencia o ambas, de la vacuna para evitar ensayos en lotes de vacunas para determinar la inmunogenia, la potencia o ambas, antes de su autorización o uso, por ejemplo, inmunizando un animal de control. Los solicitantes han apreciado que existe una correlación entre la antigenicidad de vacunas de polisacárido capsular meningocócico con respecto a anticuerpos bactericidas y la inmunogenia de dichas vacunas. Los solicitantes también han apreciado que existe una correlación entre la antigenicidad de vacunas de polisacárido capsular meningocócico con respecto a anticuerpos bactericidas y la potencia de dichas vacunas. Los procedimientos, composiciones y kits desvelados pueden usarse para evaluar la inmunogenia, la potencia o ambas, para cumplir con los criterios regulatorios gubernamentales para la autorización de lotes de fabricación de vacunas.

Vacunas de sacárido capsular meningocócico

Las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de al menos dos de los serogrupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*. En determinadas realizaciones, dichas vacunas pueden comprender adicionalmente un antígeno de uno o más de los siguientes: (a) *N. meningitidis*, serogrupo B (por ejemplo, una vesícula de membrana externa o uno o más antígenos de polipéptidos recombinantes); (b) *Haemophilus influenzae* de tipo B; (c) *Staphylococcus aureus*, (d) estreptococos de los grupos A y/o B, (e) *E. coli* patógena y/o (f) *Streptococcus pneumoniae*.

En determinadas realizaciones, las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de los serogrupos C e Y de *N. meningitidis*. En determinadas realizaciones, las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En determinadas realizaciones, las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En determinadas realizaciones, las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de *H. influenzae* de tipo B y serogrupos C e Y de *N. meningitidis*. En determinadas realizaciones, las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de *H. influenzae* de tipo B y serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En determinadas realizaciones, las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de *H. influenzae* de tipo B y serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En determinadas realizaciones, las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de *S.*

- pneumoniae* y serogrupos C e Y de *N. meningitidis*. En determinadas realizaciones, las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* y serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En determinadas realizaciones, las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* y serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En determinadas realizaciones, las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de *H. influenzae* de tipo B, *S. pneumoniae* y serogrupos C e Y de *N. meningitidis*. En determinadas realizaciones, las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de *H. influenzae* de tipo B, *S. pneumoniae* y serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. En determinadas realizaciones, las vacunas sometidas a ensayo incluyen sacáridos capsulares de *H. influenzae* de tipo B, *S. pneumoniae* y serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*.
- Los sacáridos capsulares de cada uno de estos cuatro serogrupos de *N. meningitidis* están bien caracterizados. El sacárido capsular del meningococo del serogrupo A es un homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato con unión ($\alpha 1 \rightarrow 6$), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. Los grupos acetilo pueden reemplazarse con grupos bloqueantes para evitar la hidrólisis (véase, por ejemplo, el documento WO03/080678) y dichos sacáridos modificados siguen siendo sacáridos capsulares del serogrupo A como se desvela en el presente documento. El sacárido capsular del serogrupo C es un homopolímero de ácido siálico con unión ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (ácido N-acetil neuramínico ("NeuNAc")). La mayoría de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en C-7 y/o C-8 de los restos de ácido siálico, pero aproximadamente el 15 % de los aislados clínicos carecen de estos grupos O-acetilo. La estructura del sacárido se escribe como $\rightarrow 9$ -Neu p NAc 7/8OAc- $(\alpha 2 \rightarrow$. El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades disacáridicas de ácido siálico-galactosa. Al igual que el sacárido del serogrupo C, tiene una O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico. La estructura se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 $\rightarrow 6$)-D-Gal-a-(1 \rightarrow . El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto porque la unidad de repetición disacáridica incluye glucosa en lugar de galactosa. Al igual que el serogrupo W135, tiene una O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico. La estructura del serogrupo Y se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 $\rightarrow 6$)-D-Glc- α -(1 \rightarrow .
- Los sacáridos capsulares pueden ser sacáridos capsulares nativos obtenidos de una bacteria meningocócica del serogrupo requerido. El sacárido capsular nativo puede modificarse mediante cualquier procedimiento disponible para un experto en la materia siempre que el sacárido capsular conserve al menos un epítipo que provoque anticuerpos bactericidas en suero. Se detallan a continuación modificaciones de ejemplo. Además de los sacáridos capsulares nativos y modificados, los sacáridos capsulares pueden sintetizarse químicamente siempre que el compuesto sintetizado (sacárido, análogo de sacárido, etc.) incluya al menos un epítipo que provoque anticuerpos bactericidas en suero que se unan a los sacáridos capsulares. Todos estos sacáridos capsulares nativos, modificados y sintetizados químicamente están dentro del ámbito de los sacáridos capsulares meningocócicos que se desvelan en el presente documento. A continuación se describen modificaciones y síntesis químicas de ejemplo.
- Los sacáridos capsulares en las vacunas pueden estar O-acetilados como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, con el mismo patrón de O-acetilación que se observa en los sacáridos capsulares nativos) o pueden estar parcial o totalmente des-O-acetilados en una o más posiciones de los anillos de sacárido, o pueden estar hiper-O-acetilados con respecto a los sacáridos capsulares nativos.
- Los sacáridos capsulares en las vacunas pueden ser más cortos que los sacáridos capsulares nativos observados en bacterias. Por tanto, los sacáridos pueden estar parcialmente despolimerizados, lo que ocurre normalmente después de la purificación pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de la cadena de los sacáridos. Un procedimiento de despolimerización preferido implica el uso de peróxido de hidrógeno (véase, por ejemplo, el documento WO02/058737). Se añade peróxido de hidrógeno a un sacárido (por ejemplo, para proporcionar una concentración final de H₂O₂ del 1 %) y después la mezcla se incuba (por ejemplo, a aproximadamente 55 °C) hasta que se consigue una reducción deseada de la longitud de la cadena. Otro procedimiento de despolimerización implica hidrólisis ácida (véase, por ejemplo, el documento WO03/007985). El experto en la materia conoce otros procedimientos de despolimerización. Los sacáridos capsulares utilizados en las vacunas pueden obtenerse mediante cualquiera de estos procedimientos de despolimerización. La despolimerización puede usarse con el fin de proporcionar una longitud de cadena óptima para la inmunogenia y/o para reducir la longitud de cadena para la capacidad de administración física de los sacáridos. Los sacáridos capsulares nativos se denominan normalmente polisacáridos capsulares, mientras que los sacáridos capsulares despolimerizados se denominan normalmente oligosacáridos capsulares.
- Los sacáridos capsulares sintetizados químicamente pueden tener la misma estructura química que los sacáridos capsulares nativos o modificados, pero la síntesis química permite la introducción de estructuras químicas alternativas que pueden tener propiedades superiores. A modo de ejemplo, los sacáridos capsulares meningocócicos del serogrupo A pueden sintetizarse para que tengan un enlace fosfonato $\alpha 1 \rightarrow 6$ en lugar del enlace fosfato nativo para mejorar la estabilidad de los sacáridos capsulares (véase, por ejemplo, el documento WO2006/120576).
- Las vacunas pueden formularse para proporcionar una relación sustancialmente 1:1:1:1 (medida como masa de sacárido), por ejemplo, la masa de sacárido de cada serogrupo está dentro del ± 10 % entre sí, aunque otras relaciones no afectarán a los procedimientos desvelados en el presente documento. Una cantidad habitual de antígeno meningocócico por serogrupo en una composición es de entre 1 μ g y 20 μ g, por ejemplo, entre 2 y 10 μ g por serogrupo, o aproximadamente 4 μ g o aproximadamente 5 μ g. Como alternativa a una relación 1:1:1:1, puede usarse una dosis

doble de serogrupo A (2:1:1:1).

Conjugados

Uno o más de los sacáridos capsulares en las vacunas pueden ser conjugados. La conjugación se usa para potenciar la inmunogenia de los sacáridos. La conjugación convierte la respuesta inmunitaria de T-independiente a T-dependiente. Esto permite la sensibilización de la memoria inmunitaria. La conjugación es particularmente útil para las vacunas pediátricas y es una técnica bien conocida.

Las proteínas transportadoras habituales para su uso en conjugados son toxinas bacterianas o toxoides, tales como la toxina diftérica (o su mutante CRM₁₉₇) y la toxina tetánica. Otras proteínas transportadoras conocidas incluyen la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis*, péptidos sintéticos, proteínas de choque térmico, proteínas pertúsicas, citocinas, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4+ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos, proteína D de *H. influenzae*, proteína de superficie neumocócica PspA, proteínas de captación de hierro, toxina A o B de *C. difficile*, etc. Se prefiere la conjugación covalente.

Es posible usar más de una proteína transportadora en las vacunas sometidas a ensayo. Por tanto, pueden usarse diferentes proteínas transportadoras para diferentes serogrupos, por ejemplo, pueden conjugarse sacáridos del serogrupo A con CRM₁₉₇, mientras que pueden conjugarse sacáridos del serogrupo C con toxoide diftérico. También es posible usar más de una proteína transportadora para un antígeno de sacárido particular, por ejemplo, los sacáridos del serogrupo A pueden estar en dos grupos, algunos conjugados con CRM₁₉₇ y otros conjugados con toxoide diftérico. En general, sin embargo, se prefiere usar la misma proteína transportadora para todos los sacáridos meningocócicos en la composición y, más preferentemente, para todos los sacáridos (es decir, incluyendo cualquier conjugado no meningocócico que pueda estar presente).

Una única proteína transportadora podría transportar más de un antígeno de sacárido (véase, por ejemplo, el documento GB 0323103.2). Por ejemplo, una única proteína transportadora única podría tener conjugados con ella sacáridos de los serogrupos A y C. Para conseguir este objetivo, los sacáridos pueden mezclarse antes de la reacción de conjugación. En general, sin embargo, es mucho más común tener conjugados separados para cada serogrupo.

Los conjugados en las vacunas pueden tener una relación sacárido:proteína (p/p) de entre 1:15 (es decir, proteína en exceso) y 15:1 (es decir, sacárido en exceso), entre 1:10 y 10:1, o entre 1:5 y 5:1. El exceso de proteína transportadora es normal, pero no necesario para la práctica del procedimiento desvelado.

Los conjugados pueden usarse junto con proteína transportadora libre (véase, por ejemplo, el documento WO96/40242). Cuando una proteína transportadora dada está presente tanto en forma libre como conjugada en una vacuna, sin embargo, la forma no conjugada es preferentemente no más del 5 % de la cantidad total de la proteína transportadora en la composición en su totalidad, y más preferentemente está presente en menos del 2 % en peso.

Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier engarce adecuado cuando sea necesario. El sacárido normalmente se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC y TSTU.

Los enlaces a través de un grupo de engarce pueden realizarse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos que se describen en las Patentes de los EE.UU. N.º 4.882.317 y 4.695.624. Un tipo de enlace implica la aminación reductora del polisacárido, acoplado el grupo amino resultante con un extremo de un grupo de engarce de ácido adípico, y después acoplado una proteína al otro extremo del grupo de engarce de ácido adípico. Otros engarces incluyen B-propionamido, nitrofeniletilamina, haluros de haloacilo, enlaces glucosídicos, ácido 6-aminocaproico, ADH, restos de C₄ a C₁₂, etc. Como alternativa al uso de un engarce, puede usarse un enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender la oxidación del sacárido seguida de aminación reductora con la proteína, como se describe en, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 4.761.283 y 4.356.170.

Los conjugados pueden prepararse por separado y después mezclarse para su uso en la vacuna. Después de la mezcla, la concentración de los conjugados mezclados puede ajustarse, por ejemplo, con solución salina apirógena tamponada con fosfato. Los conjugados pueden someterse a ensayo para determinar su inmunogenia antes de la mezcla, después de la mezcla o ambos.

Componentes antigénicos adicionales de las vacunas

Además de los sacáridos capsulares meningocócicos, las vacunas sometidas a ensayo pueden incluir otros antígenos sin entrar en conflicto con los procedimientos que se desvelan y, por tanto, dichas vacunas seguirán siendo vacunas de sacárido capsular meningocócico como se desvela en el presente documento. A modo de ejemplo, las vacunas de sacárido capsular meningocócico pueden incluir cualquiera de los siguientes antígenos:

1. Un sacárido capsular de *S. pneumoniae*. Los sacáridos capsulares pueden incluir sacáridos de más de un

serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, se usan ampliamente mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes, así como vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes (véase, por ejemplo, Zielen y col. (2000) *Infect. Immun.* 68: 1435-1440). Por ejemplo, PrevNar(TM) contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) con cada sacárido conjugado individualmente por aminación reductora, con 2 µg de cada sacárido por dosis de 0,5 ml (4 µg de serotipo 6B) y con conjugados adsorbidos en un adyuvante de fosfato de aluminio. Cuando los conjugados neumocócicos se incluyen en una vacuna que se ha de someter a ensayo, la composición incluye preferentemente al menos los serotipos 6B, 14, 19F y 23F.

2. Un sacárido capsular de *H. influenzae* B (Hib). Los sacáridos capsulares pueden ser no conjugados o conjugados. La proteína transportadora para el conjugado puede ser, por ejemplo, CRM₁₉₇, Dt, un toxoide tetánico o un complejo de membrana externa de *N. meningitidis*. El resto de sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo, polirribosilribitol fosfato (PRP) de longitud completa), pero es normal despolimerizar los polisacáridos capsulares para formar oligosacáridos. Un conjugado de Hib preferido comprende un oligosacárido unido covalentemente a través de un enlace de ácido adípico.

3. Un antígeno de proteína de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (véase, por ejemplo, el documento WO2004/032958). La composición puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales. Dichos antígenos pueden o no adsorberse a una sal de aluminio.

La composición de vacuna

Las vacunas de sacárido capsular meningocócico sometidos a ensayo como se desvela en el presente documento incluirán normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son normalmente macromoléculas grandes, que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa, trehalosa, lactosa y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Dichos vehículos son bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden haber presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. La solución salina fisiológica tamponada con fosfato estéril y apirógena es un vehículo habitual. Normalmente, los vehículos y diluyentes no afectarán a la puesta en práctica de los procedimientos que se desvelan en el presente documento. Sin embargo, si un vehículo o un diluyente interfiriese con un ensayo preferido, el sacárido capsular que se ha de someter a ensayo puede separarse del vehículo o diluyente antes de la etapa del ensayo que se vería afectada negativamente.

Las vacunas pueden incluir un antimicrobiano, en particular si se acondicionan en un formato de dosis múltiples.

Las vacunas pueden comprender detergente, por ejemplo, un TWEEN(TM) (polisorbato), tal como TWEEN 80 (TM). Los detergentes generalmente están presentes en niveles bajos, por ejemplo, <0,01 %.

Las vacunas pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio y/o fosfato de sodio). Estos pueden usarse para la tonicidad. Una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl es habitual, por ejemplo, aproximadamente 8,8 mg/ml. Una concentración de 1,2 mg/ml de fosfato de sodio es habitual.

Las vacunas generalmente incluirán un tampón, por ejemplo, un tampón de fosfato.

Las vacunas pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa), que puede comprender aproximadamente 15-30 mg/ml (por ejemplo, 25 mg/ml), en particular si han de liofilizarse o si incluyen material que se ha reconstituido a partir de material liofilizado. Las vacunas habituales, sin embargo, no se liofilizarán, es decir, todos los sacáridos capsulares meningocócicos están presentes en forma acuosa, desde la etapa de acondicionamiento hasta la etapa de administración. Sin embargo, en determinadas realizaciones, uno o más de los sacáridos capsulares pueden liofilizarse mientras que los sacáridos capsulares restantes están en forma líquida, por ejemplo, el sacárido capsular del serogrupo A se liofiliza mientras que los sacáridos capsulares de los serogrupos C, W135 e Y están en forma líquida. En tal caso, el ensayo puede realizarse en el componente o los componentes líquidos y el componente o los componentes liofilizados reconstituidos por separado, o el ensayo puede realizarse en la vacuna combinada donde el componente o los componentes liofilizados se reconstituyen con el componente o los componentes líquidos.

Las vacunas se formularán para la administración directamente a un paciente. Las formulaciones de entrega directa pueden ser para inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular o al espacio intersticial de un tejido) o por vía rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra administración mucosa. Se prefiere la administración intramuscular (por ejemplo, al muslo o la parte superior del brazo). La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero también puede usarse como alternativa la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular habitual es de 0,5 ml.

Los sacáridos capsulares meningocócicos de múltiples serogrupos se administran mezclados dentro de una única composición. Las vacunas pueden administrarse como una dosis única o pueden administrarse más de una vez en

una pauta de dosis múltiples. Pueden usarse dosis múltiples en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. Una pauta de dosis primaria puede ir seguida de una pauta de dosis de refuerzo de los sacáridos capsulares meningocócicos. El tiempo adecuado entre las dosis de sensibilización (por ejemplo, entre 4-16 semanas) y entre la sensibilización y el refuerzo, puede determinarse de manera rutinaria. Las vacunas pueden administrarse por practicidad al mismo tiempo que otras vacunas, por ejemplo, al mismo tiempo que una vacuna D-T-P o al mismo tiempo que una vacuna conjugada neumocócica, o al mismo tiempo que una vacuna contra la gripe, o al mismo tiempo que una vacuna MMR o MMRV. Estas vacunas generalmente se administrarán por separado, pero durante la misma visita al médico.

Las infecciones bacterianas pueden afectar a varias áreas del cuerpo y, por tanto, las vacunas pueden prepararse de diversas formas. Por ejemplo, las vacunas pueden prepararse como inyectables, ya sea en forma de soluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una composición liofilizada). Las vacunas pueden prepararse para la administración tópica, por ejemplo, en forma de una pomada, crema o polvo. Las vacunas pueden prepararse para la administración oral, por ejemplo, en forma de un comprimido o cápsula, o en forma de un jarabe (opcionalmente aromatizado). Las vacunas pueden prepararse para la administración pulmonar, por ejemplo, en forma de un inhalador, usando un polvo fino o una pulverización. Las vacunas pueden prepararse en forma de un supositorio o pesario. Las vacunas pueden prepararse para la administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, en forma de pulverización, gotas, gel o polvo. En general, sin embargo, las vacunas de sacárido capsular meningocócico se formulan para la inyección intramuscular. Un experto en la materia reconocería que algunas de las formulaciones de vacuna anteriores tendrían que someterse a ensayo antes de la formulación y/o después de la formulación donde la vacuna se procesa en una forma líquida adecuada para su uso en los ensayos, por ejemplo, formas liofilizadas que se reconstituirán con líquido; comprimidos, cápsulas, polvos y supositorios disueltos en un líquido adecuado, etc.

Las vacunas de sacárido capsular meningocócico pueden incluir opcionalmente un adyuvante tal como alumbre y/o MF59 (TM). Un experto en la materia puede determinar fácilmente si un adyuvante interferiría con la puesta en práctica de los procedimientos que se desvelan en el presente documento y puede preprocesar fácilmente la muestra de vacuna para retirar el adyuvante o evitar de otro modo que el adyuvante interfiera, por ejemplo, el sacárido capsular puede ser "desorbido" del fosfato de aluminio antes de aplicar los procedimientos que se desvelan en el presente documento.

Anticuerpos bactericidas

Los anticuerpos utilizados en las composiciones, procedimientos y kits que se desvelan en el presente documento pueden obtenerse de cualquier fuente siempre que el anticuerpo se una al sacárido capsular en la vacuna para la que debe evaluarse la inmunogenia, la potencia o ambas, y sea bactericida o se una al mismo epítipo que un anticuerpo bactericida. Preferentemente, los anticuerpos bactericidas son anticuerpos IgG. Para los fines de la presente divulgación, los anticuerpos bactericidas incluyen cualquier anticuerpo que se una a un epítipo unido por anticuerpos bactericidas. Por tanto, los anticuerpos bactericidas incluyen anticuerpos naturales y sintéticos (por ejemplo, anticuerpos modificados por ingeniería genética tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos injertados con CDR, anticuerpos sustituidos en superficie, anticuerpos aislados de presentación en fagos, minicuerpos, otras proteínas de armazón modificadas por ingeniería genética, etc.). Preferentemente, los anticuerpos bactericidas no reaccionarán de forma cruzada (es decir, solo se unirán al sacárido capsular de interés y no se unirán a los sacáridos capsulares de otros serogrupos en la vacuna). Un experto en la materia puede detectar fácilmente los anticuerpos bactericidas sin reacción cruzada (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2, "Especificidad", a continuación). Se prefieren los anticuerpos monoclonales, pero pueden usarse anticuerpos policlonales en la puesta en práctica de los procedimientos que se desvelan. Un experto en la materia podría retirar fácilmente los anticuerpos de reacción cruzada en una muestra de anticuerpos policlonales incluyendo, a modo de ejemplo, ejecutando la muestra de anticuerpos policlonales a través de una columna cromatográfica con sacáridos capsulares inmovilizados de los otros serogrupos en la vacuna.

Un experto en la materia entenderá que el sacárido capsular de interés en cualquier forma puede usarse para generar anticuerpos bactericidas que puedan usarse en la invención que se desvela en el presente documento. Puede usarse cualquier procedimiento que pueda usarse para generar anticuerpos, tal como la inmunización de un animal con un sistema inmunitario humoral, la presentación de fagos de anticuerpos seleccionados contra el sacárido capsular de interés, etc. A modo de ejemplo, pueden usarse polisacáridos capsulares, oligosacáridos capsulares y conjugados de cualquiera de los dos (y la propia vacuna o componentes sacarídicos capsulares individuales de la misma si la vacuna tiene dos o más antígenos y se han de usar anticuerpos policlonales). En determinadas realizaciones, el anticuerpo bactericida puede ser en forma de un anticuerpo que contenga la muestra de suero, anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por antígeno o anticuerpos monoclonales. El anticuerpo bactericida se une preferentemente a un sacárido capsular específico en la vacuna de interés y al sacárido de control opcional si se usa.

Control de sacárido

Cuando las composiciones, procedimientos y kits que se desvelan en el presente documento miden la unión mediante un ensayo de competencia, se usará un sacárido de control que competirá con la vacuna por la unión al anticuerpo bactericida. Un experto en la materia puede seleccionar fácilmente la forma de sacárido de control, que puede incluir

cualquiera de las formas analizadas anteriormente en la sección titulada "Vacunas de sacárido capsular meningocócico".

Evaluación de la unión del anticuerpo bactericida a la vacuna

5 Cualquier procedimiento que pueda medir cuantitativamente la unión del anticuerpo bactericida a la vacuna puede usarse con las composiciones, procedimientos y kits que se desvelan en el presente documento. Los procedimientos pueden medir directamente la unión, tal como en un ensayo sándwich o medir indirectamente la unión midiendo la unión del anticuerpo bactericida a un sacárido de control en presencia de la vacuna (tal como competidor).

10 En determinadas realizaciones, la medición de la unión a la vacuna se comparará con un patrón de una concentración conocida tal como un lote de referencia de una vacuna o polisacárido capsular purificado. Dicha comparación puede realizarse trazando los resultados para las curvas de referencia y patrón en un gráfico. Las posiciones relativas de las curvas pueden usarse para determinar la inmunogenia, la potencia o ambas, de la vacuna de ensayo.

15 Las mediciones se tomarán normalmente mediante la detección de un marcador tal como un radioisótopo, un fluoróforo o una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante). El marcador puede aplicarse a varios componentes del ensayo, tales como el anticuerpo bactericida, el antígeno que se está midiendo o un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo bactericida o al antígeno. Se desvelan a continuación procedimientos de ejemplo.

20 *ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).* ELISA implica al menos un anticuerpo bactericida que se une a un sacárido capsular meningocócico específico en la vacuna de interés. La vacuna de ensayo (medición directa) o el sacárido de control (medición de competencia indirecta) pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido (tal como una placa de pocillos múltiples), ya sea inespecíficamente (mediante adsorción a la superficie) o específicamente (mediante captura por el anticuerpo bactericida específico al sacárido capsular de interés, en un ELISA "sándwich"). Después de que el componente de sacárido capsular de la vacuna de ensayo se haya inmovilizado, puede añadirse un anticuerpo secundario para la detección que se une al componente de sacárido capsular (por ejemplo, al sacárido capsular o a una proteína transportadora de un componente conjugado de sacárido capsular) o al anticuerpo bactericida dependiendo del ensayo. El marcador que se ha de detectar puede estar unido al anticuerpo secundario o puede estar unido a un anticuerpo terciario que se une al anticuerpo secundario.

30 *Inmunoprecipitación.* La inmunoprecipitación implica precipitar el polisacárido capsular de interés en la vacuna fuera de la solución usando un anticuerpo bactericida. Los complejos inmunoprecipitados pueden medirse mediante cualquier cantidad de técnicas analíticas disponibles para un experto en la materia. Los complejos anticuerpo bactericida:sacárido capsular pueden extraerse de la solución mediante proteínas de unión a anticuerpos insolubles tales como la proteína A o la proteína G. Como alternativa a la precipitación, las proteínas de unión a anticuerpos insolubles pueden acoplarse a perlas.

35 *Transferencia puntual.* La transferencia puntual puede usarse para medir conjugados de sacárido capsular en una vacuna de ensayo. La vacuna de ensayo se aplica a una membrana (tal como nitrocelulosa o PVDF). Se permite que el anticuerpo bactericida se una al sacárido capsular y después se detecta.

40 *Radioinmunoensayo.* Los radioinmunoensayos pueden usarse para medir la unión del anticuerpo bactericida a la vacuna. En una realización, la vacuna se mezcla con una cantidad conocida de sacárido capsular radiomarcado (tal como el sacárido de control) y el anticuerpo bactericida. La vacuna no marcada competirá con el sacárido capsular radiomarcado permitiendo medir la unión y, por tanto, evaluar la inmunogenia, la potencia o ambas, de la vacuna.

Otros procedimientos que pueden usarse incluyen el ensayo de perlas citométricas, el ensayo Luminex, la transferencia de Western, la aglutinación, la nefelometría, la turbidimetría y otros.

Kits

45 Los procedimientos y composiciones que se desvelan en el presente documento pueden incorporarse en un kit para la puesta en práctica de los ensayos. Los kits de ejemplo incluirán una placa de pocillos múltiples para diluciones en serie, al menos dos sacáridos de control para unirse a la superficie de los pocillos correspondientes al serogrupo del sacárido capsular meningocócico que se ha de someter a ensayo y al menos dos anticuerpos bactericidas, cada uno de los cuales se une a uno de los sacáridos de control y uno de los al menos dos serogrupos del sacárido capsular meningocócico que se ha de someter a ensayo. Los kits también pueden incluir un tampón de dilución de anticuerpos bactericidas, que puede incluir un reactivo que estabilizó el anticuerpo bactericida con el tiempo para evitar la heterogeneidad. Los reactivos de ejemplo son detergentes tales como TWEEN 20 (TM). Los kits también pueden incluir un tampón de dilución de vacuna. En determinadas realizaciones, los sacáridos de control pueden ser: polisacáridos capsulares nativos de los serogrupos que se han de someter a ensayo, oligosacáridos capsulares de los serogrupos que se han de someter a ensayo, sacáridos sintéticos de los serogrupos que se han de someter a ensayo o conjugados de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos bactericidas en el kit pueden formularse para el almacenamiento a -20 °C en un tampón que incluye una proteína de albúmina sérica.

55 **General**

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

5 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención. El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

10 A menos que se indique específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezcla de dos o más componentes no requiere ningún orden de mezcla específico. Por tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando existen tres componentes entonces se pueden combinar dos componentes entre sí, y a continuación la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

En los casos donde se usan materiales animales (y en particular bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse de fuentes sin encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) y, en particular, sin encefalopatía espongiforme bovina (EEB). En general, se requiere cultivar las células en ausencia total de materiales derivados de animales.

15 Cuando un sustrato celular se usa para procedimientos de reasignación o de genética inversa, es preferentemente uno que se haya aprobado para su uso en la producción de vacunas humanas, por ejemplo, como en la Farmacopea Europea capítulo general 5.2.3.

La identidad entre secuencias de polipéptidos se determina preferentemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología que se implementó en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de espacio afín con parámetros de penalización abierta = 12 y penalización de extensión de hueco = 1.

20 Ejemplos

Ejemplo 1

Optimización del procedimiento ELISA para la antigenicidad de una vacuna conjugada de sacárido capsular ACWY de *N. meningitidis* tetravalente

25 Este Ejemplo 1 describe experimentos realizados para determinar condiciones y parámetros para un ensayo de unión de anticuerpos *in vitro* que puede usarse para medir la inmunogenia y la potencia de vacunas de polisacáridos capsulares que comprenden sacáridos capsulares ACWY de *N. meningitidis*. En resumen, el ensayo monitorea los cambios en la antigenicidad de dichas vacunas que pueden ocurrir durante los procedimientos de fabricación o conjugación. El principio del ensayo es un ELISA competitivo, en el que la vacuna inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo específico de serogrupo bactericida a un polisacárido capsular nativo o sustituto del mismo.

30 En una forma, el sacárido capsular de referencia se inmoviliza en una placa de microtitulación de ELISA. La vacuna de ensayo se añade al ELISA para competir con la unión del sacárido capsular de referencia inmovilizado al anticuerpo específico del serogrupo bactericida. Las propiedades antigénicas de la vacuna de ensayo pueden medirse mediante la comparación con un lote patrón de inmunogenia y potencia comprobadas en seres humanos.

Procedimiento de ensayo básico de unión a anticuerpos.

35 Los anticuerpos monoclonales bactericidas (mAb) Anti-A, Anti-C, Anti-W y Anti-Y se analizaron en un ensayo ELISA, modificado a partir de un procedimiento diseñado para la determinación específica de respuestas de anticuerpos IgG en sueros de ratones. Las placas de microtitulación se revistieron con el polisacárido capsular a una concentración final de 2,0 µg/ml, en PBS pH 7,4. Las placas se sellaron, se incubaron durante la noche a 2-8 °C, después se lavaron y se saturaron con una solución de PBS pH 7,4 que contenía gelatina porcina al 1 %, como reactivo de bloqueo, 40 durante dos horas de incubación a 37 °C. Después, las placas se fijaron con una solución salina, que contenía polivinilpirrolidona (Serva) al 4 % y sacarosa al 10 % y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas; después de la incubación, la solución de fijación se aspiró y se dejaron secar las placas durante la noche sobre la mesa de laboratorio.

45 En una placa de microtitulación de polipropileno (NUNC) separada, los competidores específicos (los polisacáridos nativos, los conjugados oligosacáridos-CRM o una vacuna conjugada tetravalente ACWY) se diluyeron con solución tampón (albúmina de suero bovino al 1 % en PBS pH 7,4 + TWEEN 20 (TM) al 0,01 %) con etapas de dilución con factor de dilución tres o cinco, dependiendo del antígeno (véase la Tabla 1). Después, el mismo volumen de mAb, a una dilución fija, se añadió en los pocillos y se permitió que interactuaran directamente con el competidor a temperatura ambiente. Después de esta etapa, la mezcla se transfirió a las placas revestidas y saturadas y se incubó durante dos 50 horas a 37 °C. Después, las placas se lavaron y se diluyó un conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón con fosfatasa alcalina 1:1500 en el tampón de dilución y se añadió a las placas. El anticuerpo secundario se incubó durante 1,5 horas a 37 °C y, después del lavado, las placas se dejaron durante 30 min a temperatura ambiente con una solución de sustrato cromógeno (fosfato de p-nitrofenilo 1 mg/ml de Sigma). Los valores de absorbancia se leyeron a una longitud de onda de 405-620 nm.

Los anticuerpos monoclonales anti-A, Anti-C, Anti-W y Anti-Y eran cada uno anticuerpos bactericidas dirigidos específicamente contra uno de los cuatro sacáridos capsulares meningocócicos A, C, W135 e Y, A, C, W135 e Y, respectivamente.

Tabla 1: Diseño de placas para los antígenos MenA y MenC (columnas 1 y 12, filas A y H = blanco; fila B = mAb Anti-A o Anti-C, a dilución fija, sin ningún competidor; filas C-G = mAb Anti-A o Anti-C, a dilución fija, a las que se añaden el competidor (el polisacárido nativo o el conjugado oligosacárido-CRM o una vacuna conjugada ACWY tetraivalente) a 10 diluciones con factor de dilución tres (mAb Anti-C) o cinco (mAb Anti-A), a partir de 10000 ng/ml (MenA) o 5000 ng/ml (MenC, MenW135 y MenY).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	
C		10000	2000	400	80	16	3,2	0,64	0,128	0,26	0,0051	
D		10000	2000	400	80	16	3,2	0,64	0,128	0,26	0,0051	
E		10000	2000	400	80	16	3,2	0,64	0,128	0,26	0,0051	
F		10000	2000	400	80	16	3,2	0,64	0,128	0,26	0,0051	
G		10000	2000	400	80	16	3,2	0,64	0,128	0,26	0,0051	
H												
A												
B		10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	
C		5000	1667	556	185	62	21	7	2,3	0,8	0,3	
D		5000	1667	556	185	62	21	7	2,3	0,8	0,3	
E		5000	1667	556	185	62	21	7	2,3	0,8	0,3	
F		5000	1667	556	185	62	21	7	2,3	0,8	0,3	
G		5000	1667	556	185	62	21	7	2,3	0,8	0,3	
H												

Optimización del ensayo

5 *Revestimiento de sacárido:* Los inventores compararon las placas revestidas con los polisacáridos nativos con las placas revestidas con conjugados oligosacárido-CRM. Los inventores compararon las curvas de inhibición de los anticuerpos monoclonales usando dos competidores diferentes: un control negativo para el que se esperaba menos competencia y una referencia de un lote de vacuna Menveo que se había sometido a ensayo en ensayos clínicos. El experimento se realizó usando dos placas para cada antígeno: una revestida con el polisacárido nativo (PS) y otra revestida con el conjugado oligosacárido-CRM. La dilución final de mAb en placas revestidas con PS nativo fue:

anti-A 1:10000

anti-C 1:40000

10 anti-W 1:250

anti-Y 1:800

La dilución final de mAb en placas revestidas con oligosacárido-CRM fue:

anti-A 1:40000

anti-C 1:160000

15 anti-W 1:1000

anti-Y 1:10000

20 Los competidores se diluyeron con una dilución escalonada con factor de dilución 5 (MenA) o 3 (MenC, MenW135, MenY), comenzando a partir de la misma concentración tanto para la vacuna de referencia como para el control negativo: 10 µg/ml para MenA y 5 µg/ml para MenCWY. Como se muestra en las **FIG. 1A-1H**, cada revestimiento produjo una tendencia comparable para las curvas de MenA, MenW135 y MenY, mientras que el revestimiento conjugado oligosacárido-CRM mostró una inhibición parcial para la curva de MenC, incluso a la concentración más alta de competidor. Por tanto, experimentos de optimización adicionales en estos Ejemplos usaron placas revestidas con los polisacáridos nativos para los cuatro antígenos.

25 *Anticuerpo secundario (Ab II):* En este experimento, los inventores compararon la intensidad de la señal de dos tipos de anticuerpos secundarios: conjugado de fosfatasa alcalina (AP) y conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP). Los anticuerpos secundarios se sometieron a ensayo analizando los anticuerpos monoclonales a una dilución fija (Anti-A 1:10000; Anti-C 1:10000; Anti-W 1:2000; y Anti-Y 1:200), sin añadir ningún competidor.

30 La densidad óptica media y el coeficiente de varianza para cada placa se muestran en la **Tabla 2**, a continuación. Los dos conjugados de anticuerpos secundarios produjeron resultados esencialmente idénticos, excepto porque la Placa de Anti-Y que usa el anticuerpo secundario HRP mostró un % de CV significativamente más bajo que la Placa de Anti-Y que usa el anticuerpo secundario de AP. Sin embargo, puesto que los resultados obtenidos con el anticuerpo secundario de AP fueron aceptables para los cuatro antígenos, este anticuerpo secundario se seleccionó para los experimentos a continuación.

Tabla 2: DO media y % de CV a través de la placa para los dos anticuerpos secundarios.

	Media	DT	% de CV
Ab Anti-MenA + Ab secundario de AP	1428	196	14
Ab Anti-MenA + Ab secundario de HRP	1273	125	10
Ab Anti-MenC + Ab secundario de AP	1346	201	15
Ab Anti-MenC + Ab secundario de HRP	1179	145	12
Ab Anti-MenW + Ab secundario de AP	1214	136	11
Ab Anti-MenW + Ab secundario de HRP	882	111	13
Ab Anti-MenY + Ab secundario de AP	1182	194	16
Ab Anti-MenY + Ab secundario de HRP	1473	73	5

35 *Tampones de dilución de anticuerpos monoclonales y secundarios:* Con el fin de seleccionar el tampón de dilución más apropiado en el que diluir los anticuerpos anti-sacárido capsular y el anticuerpo secundario, se sometieron a ensayo cuatro tampones diferentes. Los anticuerpos monoclonales sin competidores se diluyeron con cuatro tampones

y se analizaron en la misma placa (una fila para blanco, tres filas para el mAb diluido en uno de los cuatro tampones).

Tampón 1: PBS IX + TWEEN 20 (TM) al 0,01 % + BSA al 1 %

Tampón 2: PBS 0,5X + TWEEN 20 (TM) al 0,05 % + BSA al 1 %

Tampón 3: PBS IX + TWEEN 20 (TM) al 0,05 %

5 Tampón 4: PBS IX + TWEEN 20 (TM) al 0,01 % + BSA al 0,5 %

Los cuatro tampones produjeron resultados similares (Véase la **Tabla 3**). Puesto que el tampón 1 ya estaba en uso, se usó tampón 1 en los experimentos a continuación.

Tabla 3: Comparación de cuatro tampones diferentes

<i>Estabilidad de anticuerpos prediluidos</i>			
	Media	DT	% de CV
Tampón anti-MenA 1	1480	209	14
Tampón anti-MenA 2	884	101	11
Tampón anti-MenA 3	1380	212	15
Tampón anti-MenA 4	1099	221	20
Tampón anti-MenC 1	666	41	6
Tampón anti-MenC 2	306	20	7
Tampón anti-MenC 3	570	47	8
Tampón anti-MenC 4	541	69	13
Tampón anti-MenW 1	746	63	8
Tampón anti-MenW 2	737	64	9
Tampón anti-MenW 3	576	86	15
Tampón 4	427	61	14
Tampón anti-MenY 1	640	57	9
Tampón anti-MenY 2	594	36	6
Tampón anti-MenY 3	659	53	8
Tampón anti-MenY 4	651	52	8

10 Para comprobar si los anticuerpos anti-sacárido capsular fueron estables a 2-8 °C después de la dilución con el tampón de dilución, se preparó una solución diluida de cada anticuerpo primario usando dos tampones diferentes (tampón 1: PBS 1X + TWEEN 20 (TM) al 0,01 % + BSA al 1 %; tampón 2: PBS 1X). Los anticuerpos primarios se diluyeron en ambos tampones de la siguiente manera:

anti-A: 1:5000 (final en placa 1:10000)

anti-C: 1:10000 (final en placa 1:20000)

15 anti-W: 1:125 (final en placa 1:250)

anti-Y: 1:400 (final en placa 1:800)

20 Las preparaciones de anticuerpos primarios se analizaron, para cada antígeno, el día 1, el día 2 y el día 3, compitiendo con la vacuna Menveo y un control negativo. El tampón 2 demostró ser inadecuado para MenA y MenC ya que los anticuerpos primarios parecían haber desaparecido al final del segundo día. No se observaron diferencias entre los dos tampones sometidos a ensayo para MenW135 y MenY durante los tres días sometidos a ensayo, lo que indica que estos mAb diluidos son estables a 2-8 °C hasta 3 días.

Evaluación de la estabilidad de mAb almacenados a -20 °C. Para evaluar una fuente potencial de variabilidad experimental, los inventores comprobaron la concentración de proteína de un subconjunto de alícuotas monoclonales mediante el uso del ensayo BCA. Esto reveló heterogeneidad en el contenido de proteína de las alícuotas almacenadas

a -20 °C, en solución salina tamponada. Para reducir la presente heterogeneidad, los mAb se prediluyeron en PBS IX + BSA al 1 % a diferentes concentraciones de proteína, dependiendo del antígeno (anti-A 1:1000; antiC 1:1000; anti-W 1:20; anti-Y 1:50). Estas preparaciones se dividieron en alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -20 °C.

5 La concentración de proteína de cada preparación de mAb se sometió a ensayo en un subconjunto aleatorio de muestras. Se descongelaron alícuotas de mAb justo antes de su uso y se diluyeron adicionalmente a la dilución de trabajo (1:5 para anti-A, anti-C y anti-W y 1:8 para anti-Y). Cada alícuota se usó solo una vez. Después de descongelar y diluir y añadir el competidor, la dilución de mAb en la placa fue la siguiente:

anti-A: 1:10000

anti-C: 1:10000

10 anti-W: 1:200

anti-Y: 1:800

Para los experimentos a continuación, si no se indica expresamente lo contrario, los mAb se usaron en los experimentos a estas concentraciones y diluciones.

15 *Evaluación de la estabilidad del revestimiento.* Con el fin de comprobar la estabilidad de las placas revestidas después de su preparación, se realizaron dos experimentos:

Día 2: el primer día las placas estaban listas para usarse después de la preparación (corresponde al día 0 para la evaluación de la estabilidad del revestimiento)

Día 8: seis días después del revestimiento y la saturación de la placa.

20 El día 2, se sometieron a ensayo dos placas/antígeno de manera que cada placa se usó para generar seis curvas de inhibición para el análisis: tres por competencia de los mAb con los lotes de referencia de vacuna Menveo y tres con los lotes de ensayo de vacuna Menveo.

El día 8 se analizó una placa/antígeno, con el mismo esquema de placa descrito anteriormente.

25 Las alícuotas de mAb utilizadas en los experimentos se prediluyeron como se ha descrito anteriormente. La vacuna Menveo se diluyó, después de la reconstitución, con etapas de dilución con factor de dilución 5 para MenA y etapas de dilución con factor de dilución 3 para MenC, MenW135 y MenY. Los resultados mostraron una diferencia significativa entre los dos conjuntos de placas en las curvas de respuesta de MenA generadas. Las curvas de respuesta para MenC, MenW135, MenY no mostraron diferencias relevantes entre las placas recién preparadas y las placas almacenadas a 4 °C durante 6 días.

30 *Controles negativos.* Con el fin de comprobar la sensibilidad del procedimiento, se prepararon y sometieron a ensayo controles negativos que mostrarían menos competencia para unirse a los mAb. El lote de vacuna Menveo sometido a ensayo y que se demostró que era inmunógeno y potente en seres humanos se usó como muestra de referencia.

En cada placa, tanto la vacuna como el control negativo se ejecutaron por triplicado, con dilución escalonada 1:5 para MenA y 1:3 para MenC, MenW135, MenY. Los mAb se sometieron a ensayo a una dilución fija, como se ha descrito anteriormente.

35 Las curvas de inhibición obtenidas con los controles negativos presentaron una tendencia diferente en comparación con la muestra de referencia. Los controles negativos, como se esperaba, tenían una actividad de inhibición claramente inferior (véanse, por ejemplo, las FIG. 6A-6D). El análisis de las curvas indicó que las curvas de control negativo y las curvas del lote de referencia de vacuna Menveo muestran una amplia separación para las muestras no diluidas y las primeras etapas de dilución, mientras que las curvas convergen a una dilución mayor (es decir, sin inhibición).

40 *Robustez - Homogeneidad del revestimiento.* Se analizaron seis placas/antígeno (misma preparación de revestimiento) para cada antígeno. Los 96 pocillos de cada placa se llenaron con 100 µl de la misma solución (diferente para cada antígeno). Las soluciones consistieron en el mAb en la dilución fija anterior y el lote de referencia de vacuna Menveo a una concentración seleccionada. La concentración de la vacuna se eligió, para cada mAb, en la parte media de la región lineal de las curvas de inhibición.

45 La vacuna se diluyó a las siguientes concentraciones, dependiendo del antígeno:

MenA: 6 ng/ml (concentración final en placa: 3 ng/ml)

MenC: 124 ng/ml (concentración final en placa: 62 ng/ml)

MenW: 1112 ng/ml (concentración final en placa: 556 ng/ml)

MenY: 370 ng/ml (concentración final en placa: 185 ng/ml)

ES 2 744 471 T3

Los resultados (DO medias y % de CV) se muestran en la Tabla 4. Como indican los valores de % de CV determinados, las condiciones sometidas a ensayo no produjeron diferencias significativas en las respuestas.

Tabla 4.

	Media	DT	% de CV
Placa de Anti-MenA 1	1336	106	7,9
Placa de Anti-MenA 2	1566	167	10,7
Placa de Anti-MenA 3	1288	142	11,0
Placa de Anti-MenA 4	1435	151	10,5
Placa de Anti-MenA 5	1260	165	13,1
Placa de Anti-MenA 6	1434	125	8,7
Anti-MenA - General	1386	177	12,8
Placa de Anti-MenC 1	1274	103	8,1
Placa de Anti-MenC 2	1255	131	10,5
Placa de Anti-MenC 3	1287	91	7,1
Placa de Anti-MenC 4	1579	110	6,9
Placa de Anti-MenC 5	1338	87	6,5
Placa de Anti-MenC 6	1439	81	5,6
Anti-MenC - General	1362	153	11,2
Placa de Anti-MenW 1	934	105	11,2
Placa de Anti-MenW 2	898	81	9,0
Placa de Anti-MenW 3	884	86	9,7
Placa de Anti-MenW 4	854	86	10,0
Placa de Anti-MenW 5	848	78	9,2
Placa de Anti-MenW 6	1033	76	7,3
Anti-MenW - General	908	106	11,7
Placa de Anti-MenY 1	663	73	11,6
Placa de Anti-MenY 2	785	53	6,7
Placa de Anti-MenY 3	701	72	10,2
Placa de Anti-MenY 4	795	90	11,3
Placa de Anti-MenY 5	795	79	10,0
Placa de Anti-MenY 6	799	74	9,3
Placa de Anti-MenY - General	751	97	12,9

Robustez - Tiempos de incubación. Se sometieron a ensayo tres condiciones (véase la **Tabla 5**)

5

Tabla 5: Tres condiciones diferentes sometidas a ensayo.

	Tiempo de incubación 1	Tiempo de incubación 2	Tiempo de incubación 3
Ab I (mAb + Menveo)	1 hora 50 minutos	2 horas	2 horas 10 minutos
Ab II	1 hora 20 minutos	1 hora 30 minutos	1 hora 40 minutos
Desarrollo	27 minutos	30 minutos	33 minutos

5 El tiempo de incubación 2 corresponde a los períodos normales de incubación aplicados anteriormente. Para cada condición, se sometió a ensayo una placa/antígeno; en cada placa, se analizaron tres curvas de inhibición por competencia de los mAb con el lote de referencia de vacuna Menveo. Las alícuotas de mAb utilizadas en los experimentos se prediluyeron como se ha descrito anteriormente. La vacuna Menveo se diluyó, después de la reconstitución, con diluciones con factor de dilución 5 para MenA y diluciones con factor de dilución 3 para MenC, MenW135 y MenY.

Los resultados no mostraron diferencias relevantes entre los tiempos de incubación sometidos a ensayo.

Robustez - Concentraciones de revestimiento. Se sometieron a ensayo tres concentraciones de revestimiento para cada polisacárido nativo:

- 10
- 1 - 1 µg/ml
 - 2 - 2 µg/ml
 - 3 - 5 µg/ml

15 Para cada concentración, se sometieron a ensayo cuatro placas/antígeno (denominadas placa a, b, c y d). Para cada antígeno, las placas a y b se sometieron a ensayo el primer día y las placas c y d se sometieron a ensayo el segundo día. En cada placa, se analizaron seis curvas de inhibición por competencia de los mAb con el lote de referencia de vacuna Menveo. Se usaron alícuotas de mAb prediluidas como se ha descrito anteriormente. La vacuna Menveo se diluyó, después de la reconstitución, con etapas de dilución con factor de dilución 5 para MenA y etapas de dilución con factor de dilución 3 para MenC, MenW135 y MenY.

Los resultados no mostraron diferencias relevantes entre las concentraciones sometidas a ensayo.

20 *Reproducibilidad.* Para los experimentos de reproducibilidad, el esquema experimental fue el siguiente:

- 2 operadores
- 2 placas/antígeno/operador
- 3 días, 1 experimento/operador/día

25 En cada placa, se analizaron seis curvas de inhibición: tres por competencia de los mAb con el lote de referencia de vacuna Menveo y tres con el lote de ensayo de vacuna Menveo. El lote de ensayo es comparable al lote de referencia, puesto que se produjo mediante el mismo procedimiento y demostró ser inmunógeno y potente en ensayos clínicos en un grado similar al lote de referencia.

30 Durante el segundo y el tercer día, se sometieron a ensayo cuatro curvas de inhibición (dos para cada lote de vacuna). El diseño de la placa se diseñó para que fuera similar al de la **Tabla 1** basándose en la evaluación estadística de los efectos de borde. Se usaron alícuotas de mAb prediluidas como se ha descrito anteriormente. Se diluyó vacuna Menveo, después de la reconstitución, con etapas de dilución con factor de dilución 5 para MenA y etapas de dilución con factor de dilución 2 (en lugar de con factor de dilución 3 como en los experimentos anteriores) para MenC, MenW135 y MenY.

35 Los datos de reproducibilidad se procesaron para la evaluación de la potencia relativa, que es una medida tanto de la inmunogenia como de la potencia de una vacuna usando una hoja de Excel. La evaluación de potencia se realizó usando el procedimiento de línea paralela como se describe en la Farmacopea Europea 6.0. De acuerdo con este modelo, la relación entre la transformación logarítmica de la dosis y la respuesta (DO o una transformación) puede representarse como una línea recta, sobre el intervalo de dosis utilizadas; el modelo se basa en el supuesto de paralelismo entre la preparación desconocida y la preparación patrón. La distancia horizontal entre las dos líneas es la estimación de la potencia de la preparación desconocida con respecto al patrón.

40 En particular, después de elegir el intervalo lineal de cada curva, la potencia relativa se calcula como:

$$Potencia\ relativa = anti\ log\left(-\frac{Intersección_{MUE}-Intersección_{PAT}}{b_{COM}}\right)$$

donde:

- 45
- b_{COM} es la pendiente común
 - Intersección_{MUE} es la intersección de la curva Muestra, suponiendo una pendiente común
 - Intersección_{PAT} es la intersección de la curva Patrón, suponiendo una pendiente común

En la **Tabla 6**, se describen los valores de potencia media y el porcentaje de coeficiente de variación. Dada la naturaleza exponencial de la potencia, el % de CV se calculó como la desviación típica de las potencias logarítmicas naturales, multiplicado por el 100 %.

ES 2 744 471 T3

Los criterios de aceptación para la discriminación de placas no válidas son:

- R cuadrado de las curvas de vacuna referencia y de ensayo: $\geq 0,95$
- No paralelismo de valor de p: $\geq 0,05$

Tabla 6

		Potencia de MenA					
		16/02/2010		24/02/2010		25/02/2010	
Operador	Placa	Potencia	Ln-potencia	Potencia	Ln-potencia	Potencia	Ln-potencia
Op1-CB	placa 1	0,3875	-0,9480	0,3547	-1,0365	0,5347	-0,6261
Op1-CB	placa 2	0,4429	-0,8144	0,3813	-0,9641		
Op2-FG	placa 1	0,4289	-0,8466	0,3069	-1,1813	0,4429	-0,8144
Op2-FG	placa 2	0,5095	-0,6744	0,2698	-1,3101	0,4941	-0,7049

	Potencia	Ln-potencia	
media	0,4058	-0,9019	<div style="display: inline-block; width: 20px; height: 20px; background-color: #cccccc; border: 1px solid black;"></div> placa no válida
DT		0,2130	
% de CV	21		

		Potencia de MenC					
		18/02/2010		24/02/2010		25/02/2010	
Operador	Placa	Potencia	Ln-potencia	Potencia	Ln-potencia	Potencia	Ln-potencia
Op1-CB	placa 1	1,1206	0,1139	1,0538	0,0524	0,9906	-0,0094
Op1-CB	placa 2	1,1594	0,1479	0,9720	-0,0284	1,0111	0,0110
Op2-FG	placa 1	1,0959	0,0916	1,1183	0,1118	1,1135	0,1075
Op2-FG	placa 2	1,2051	0,1866	1,2924	0,2565	1,1829	0,1680

	Potencia	Ln-potencia
media	1,1060	0,1008
DT		0,0842
% de CV	8	

		Potencia de MenW					
		16/02/2010		24/02/2010		25/02/2010	
Operador	Placa	Potencia	Ln-potencia	Potencia	Ln-potencia	Potencia	Ln-potencia
Op1-CB	placa 1	0,9218	-0,0814	0,8446	-0,1689	0,8762	-0,1322
Op1-CB	placa 2	0,8548	-0,1568	0,8241	-0,1935	0,9613	-0,0395
Op2-FG	placa 1	0,9042	-0,1007	0,8607	-0,1500	0,9548	-0,0463
Op2-FG	placa 2	0,8332	-0,1824	0,7838	-0,2436	0,8551	-0,1566

	Potencia	Ln-potencia
media	0,8714	-0,1377
DT		0,0609
% de CV	6	

(continuación)

		Potencia de MenY					
		18/02/2010		24/02/2010		25/02/2010	
Operador	Placa	Potencia	Ln-potencia	Potencia	Ln-potencia	Potencia	Ln-potencia
Op1-CB	placa 1	0,8649	-0,1451	0,9047	-0,1002	0,8980	-0,1076
Op1-CB	placa 2	0,8971	-0,1086	0,9210	-0,0823	1,1147	0,1086
Op2-FG	placa 1	0,9580	-0,0429	0,9166	-0,0871	0,8199	-0,1986
Op2-FG	placa 2	0,9360	-0,0661	1,0059	0,0059	1,1492	0,1391

media	Potencia	Ln-potencia
DT	0,9445	-0,0571
% de CV		0,0984
		10

5 *Comparación de 3 lotes de ensayo de vacuna Menveo con el lote de referencia. Se analizaron tres lotes de vacunas producidos recientemente en comparación con el lote de referencia. Cada lote se sometió a ensayo por triplicado, en cada placa se analizaron cuatro curvas de inhibición: dos por competencia de los mAb con el lote de referencia de vacuna Menveo y dos con el lote de ensayo de vacuna Menveo en investigación (lote 1, 2 o 3).*

Los resultados, expresados como valores de potencia y de % de CV, se describen en la **Tabla7**:

		Potencia de MenA										
		26/02/2010				26/02/2010				02/03/2010		
vacuna	Operador	Placa	Potencia	Ln-potencia	Operador	vacuna	Potencia	Ln-potencia	Operador	vacuna	Potencia	Ln-potencia
lote 1	Op1-CB	placa 1	0,6581	-0,4185	Op2-FG	lote 2	0,9377	-0,0644	Op2-FG	lote 3	0,7868	-0,2398
lote 1	Op1-CB	placa 2	0,6752	-0,3927	Op2-FG	lote 2			Op2-FG	lote 3	0,9138	-0,0901
lote 1	Op1-CB	placa 3	0,7365	-0,3058	Op2-FG	lote 2	0,9036	-0,1014	Op2-FG	lote 3	0,9652	-0,0354

media	Potencia	Ln-potencia
DT	0,7178	-0,2060
% de CV		0,1534
		15

 placa no válida

		Potencia de MenC										
		26/02/2010				26/02/2010				02/03/2010		
vacuna	Operador	Placa	Potencia	Ln-potencia	Operador	vacuna	Potencia	Ln-potencia	Operador	vacuna	Potencia	Ln-potencia
lote 1	Op1-CB	placa 1	0,7305	-0,3140	Op2-FG	lote 2	0,7185	-0,3306	Op2-FG	lote 3	0,7190	-0,3299
lote 1	Op1-CB	placa 2	0,7071	-0,3466	Op2-FG	lote 2	0,6993	-0,3577	Op2-FG	lote 3	0,7781	-0,2509
lote 1	Op1-CB	placa 3	0,6854	-0,3778	Op2-FG	lote 2	0,7160	-0,3341	Op2-FG	lote 3	0,7300	-0,3147

media	Potencia	Ln-potencia
DT	0,7200	-0,3285
% de CV		0,0355
		4

		Potencia de MenW										
		26/02/2010				26/02/2010				02/03/2010		
vacuna	Operador	Placa	Potencia	Ln-potencia	Operador	vacuna	Potencia	Ln-potencia	Operador	vacuna	Potencia	Ln-potencia
lote 1	Op1-CB	placa 1	0,9279	-0,0749	Op2-FG	lote 2	0,8925	-0,1137	Op2-FG	lote 3	0,8207	-0,1975
lote 1	Op1-CB	placa 2	0,9202	-0,0832	Op2-FG	lote 2	0,9835	-0,0166	Op2-FG	lote 3	1,0497	0,0485
lote 1	Op1-CB	placa 3	0,9633	-0,0374	Op2-FG	lote 2	0,9196	-0,0839	Op2-FG	lote 3	1,0161	0,0159

10

(continuación)

	Potencia	Ln-potencia
media	0,9415	-0,0603
DT		0,0734
% de CV	7	

		Potencia de MenY										
vacuna	Operador	Placa	26/02/2010		Operador	vacuna	26/02/2010		Operador	vacuna	02/03/2010	
			Potencia	Ln-potencia			Potencia	Ln-potencia			Potencia	Ln-potencia
lote 1	Op1-CB	placa 1	0,7135	-0,3376	Op2-FG	lote 2	0,8479	-0,1650	Op2-FG	lote 3	0,8627	-0,1476
lote 1	Op1-CB	placa 2	0,7631	-0,2703	Op2-FG	lote 2	0,8236	-0,1941	Op2-FG	lote 3	0,8022	-0,2204
lote 1	Op1-CB	placa 3	0,7857	-0,2412	Op2-FG	lote 2	0,8242	-0,1934	Op2-FG	lote 3	0,8276	-0,1892

	Potencia	Ln-potencia
media	0,8044	-0,2176
DT		0,0585
% de CV	6	

Análisis de resultados

5 *Revestimientos de placas.* La comparación entre los dos procedimientos de revestimiento no mostró diferencias relevantes para los antígenos MenA, MenW135 y MenY, mientras que para el antígeno MenC el revestimiento con el conjugado de CRM dio como resultado una inhibición parcial del anticuerpo monoclonal a concentración de anticuerpo similar.

Se prefieren los polisacáridos simples y se eligieron como antígeno de revestimiento para el protocolo de ensayo final.

10 *Anticuerpo secundario (Ab II).* Los valores de absorbancia de los cuatro anticuerpos monoclonales sometidos a ensayo a una dilución fija mostraron resultados similares mediante el uso de fosfatasa alcalina frente a peroxidasa de rábano picante.

Para el protocolo de ensayo final, se seleccionó la fosfatasa alcalina como la condición preferida para todos los antígenos.

15 *Tampones de dilución de anticuerpos monoclonales y secundarios.* Todos los tampones sometidos a ensayo mostraron respuestas similares. El tampón 1 (PBS IX + TWEEN 20 (TM) al 0,01 % + BSA al 1 %) se seleccionó para el protocolo de ensayo final.

20 *Estabilidad de diluciones de mAb.* Los resultados demostraron que los mAb eran estables a +2-8 °C hasta 3 días una vez diluidos en el tampón de dilución 1: PBS IX + TWEEN 20 (TM) al 0,01 % + BSA al 1 %. El tampón 2 (PBS) mostró una estabilidad adecuada para los mAb anti-A y anti-C.

Estabilidad de mAb a -20 °C. Las alícuotas monoclonales se diluyeron con PBS + BSA al 1 % y se comprobaron para determinar el contenido de proteína y la homogeneidad. Los cuatro mAb se diluyeron de manera diferente dependiendo del antígeno (véase párrafo) y se almacenaron como alícuotas de 1 ml a -20 °C.

25 *Estabilidad de revestimiento.* Los resultados obtenidos con el antígeno MenA mostraron una diferencia significativa en las curvas de respuesta entre las placas recién preparadas y las placas almacenadas durante 6 días después de la preparación. Para los antígenos MenC, MenW135, MenY, no se observaron diferencias relevantes entre el día 0 y el día 6 a 4 °C.

Controles negativos. La sensibilidad del ensayo se demostró mediante las curvas de inhibición obtenidas con los controles negativos, que presentaron una menor actividad de inhibición en comparación con la vacuna patrón.

30 *Robustez - Homogeneidad del revestimiento.* La homogeneidad del revestimiento se evaluó para los cuatro mAb como se ha descrito anteriormente y los resultados indicaron que no hubo diferencias relevantes en el % de CV de los valores de absorbancia cuando se trataron las placas individuales como los valores medios determinados para todas las placas analizadas. Para los cuatro antígenos, el % de CV individual y el medio son inferiores al 15 %.

35 *Robustez - Tiempos de incubación.* Los resultados no revelaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones sometidas a ensayo. Los tiempos de incubación seleccionados para el Ab primario, para el Ab secundario y para la reacción colorimétrica fueron de 2 horas; 1 hora y 30 minutos, y 30 minutos, respectivamente.

Robustez - Concentraciones de revestimiento. La concentración de revestimiento seleccionada para el protocolo de

ensayo final fue de 2 µg/ml de polisacárido simple. Los resultados indicaron que no hubo diferencias relevantes entre las concentraciones de revestimiento sometidas a ensayo, aparte de la concentración de 1 µg/ml, lo que dio como resultado un aumento de la curvatura de las curvas de inhibición. Esta característica de las curvas de respuesta no es apropiada para una determinación de potencia relativa.

- 5 **Reproducibilidad.** Los datos de reproducibilidad mostraron resultados aceptables, como lo indica el % de CV de los valores de potencia que están por debajo del 25 % para MenA y por debajo del 15 % para MenC, MenW135 y MenY.

10 **Ensayo de 3 lotes de vacuna Menveo en comparación con el lote de referencia.** Los resultados obtenidos mediante comparación, en la misma placa, del lote de referencia de vacuna y un lote de vacuna Menveo recientemente producido (tres lotes recientes sometidos a ensayo en total), mostraron la similitud de los lotes en investigación. Como se muestra en la **Tabla 7**, el % de CV de los valores de potencia es inferior al 20 %.

Ejemplo 2

Validación del procedimiento de ELISA para la antigenicidad de una vacuna conjugada de sacárido capsular ACWY de *N. meningitidis* tetravalente

Protocolo utilizado para la validación.

15 Este ejemplo resume la validación de una realización del ensayo de inmunogenia y potencia de anticuerpos *in vitro* que es evaluar la antigenicidad de una vacuna conjugada de sacárido capsular ACWY de *N. meningitidis* tetravalente. El ensayo es un ELISA competitivo en el que la vacuna compite con anticuerpos monoclonales específicos del serogrupo bactericida (anti-MenA, anti-MenC, anti-MenW135 y anti-MenY) en la unión a controles de sacárido capsular nativo. Las curvas de inhibición obtenidas con un lote de vacuna de referencia de potencia e inmunogenia conocidas
20 en seres humanos se compararon con las obtenidas con un lote de vacuna de ensayo usando un cálculo de potencia relativa, que es una medida de la inmunogenia y potencia de una vacuna. La validación incluyó la reconstitución de la fase del producto liofilizado CRM-MenA con el producto conjugado de MenC, W, Y cargado en jeringuillas y con el producto conjugado de MenC, W, Y cargado en viales.

Procedimiento de ensayo.

25 Las placas de microtitulación se revistieron con el polisacárido capsular a una concentración final de 2,0 µg/ml, en PBS pH 7,4. Las placas se sellaron, se incubaron durante la noche a 2-8 °C, después se lavaron y se saturaron con una solución de PBS pH 7,4 que contenía gelatina porcina al 1 %, como reactivo de bloqueo, para una incubación de dos horas a 37 °C. Después, las placas se fijaron con una solución salina, que contenía polivinilpirrolidona al 4 % y sacarosa al 10 % y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Después de incubar, se aspiró la solución
30 de fijación y se dejaron secar las placas durante la noche sobre la mesa de laboratorio.

En una placa de microtitulación de polipropileno diferente, los competidores específicos (vacuna de referencia Menveo sometida a ensayo en ensayos clínicos en seres humanos y lote de ensayo Menveo) se diluyeron con solución tampón (albúmina de suero bovino al 1 % en PBS pH 7,4 con TWEEN 20 (TM) al 0,01 %) con dilución con factor de dilución 2 (MenCWY) o factor de dilución 5 (MenA), dependiendo del antígeno. Después, el mismo volumen de mAAb (anti-A, anti-
35 C, anti-W y anti-Y), a una dilución fija, se añadió a los pocillos y se permitió que interactuaran directamente con el competidor a temperatura ambiente. Después de esta etapa, la mezcla se transfirió a las placas revestidas y saturadas y se incubó durante dos horas a 37 °C. Después se lavaron las placas y se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina. El anticuerpo secundario se incubó durante 1,5 horas a 37 °C y, después del lavado, las placas se dejaron durante 30 min a temperatura ambiente con una solución de sustrato cromógeno. Las
40 placas se bloquearon con una solución de NaOH y después se leyeron los valores de absorbancia a una longitud de onda de 405-620 nm.

La curva de respuesta de un lote de vacunas en investigación se determinó mediante una evaluación de potencia relativa con respecto a la vacuna de referencia, usando el Modelo de Línea Paralela, como se describe en la Farmacopea Europea 6.0. De acuerdo con este modelo, la relación entre la transformación logarítmica de la dosis y
45 la respuesta (DO o una transformación) puede representarse como una línea recta sobre el intervalo de dosis utilizadas; El modelo se basa en el supuesto de paralelismo entre la vacuna desconocida y la de referencia. La distancia horizontal entre las dos líneas indica la potencia y la inmunogenia del lote desconocido con respecto al lote de referencia.

Procedimiento de validación y resultados.

50 Los análisis de validación se realizaron en los laboratorios de GICC (que cumplen con BPF) por un operador de RC, debidamente capacitado, y por dos operadores de GICC para la transferencia conjunta del procedimiento.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Precisión:
 - Repetibilidad

◦ Reproducibilidad

- Linealidad
- Especificidad
- Precisión

- 5
- Intervalo
 - Robustez

◦ Estabilidad del revestimiento

10 *Precisión - Repetibilidad.* La repetibilidad del procedimiento se evaluó mediante el análisis de 6 réplicas de cada antígeno (6 placas conteniendo cada una la vacuna de referencia y la vacuna de ensayo, el componente liofilizado de CRM-MenA y el componente líquido de MenCWY de la jeringuilla precargada y el componente líquido de MenCWY del vial), distribuido como se muestra en la Tabla 1 anterior. Cada antígeno se sometió a ensayo por el operador de RC en la misma sesión analítica.

Los resultados se muestran como valor de potencia, logaritmo natural de valor de potencia y porcentaje de coeficiente de variación (% de CV) de los valores de potencia.

15 El coeficiente de variación de la potencia se calculó usando la expansión de Taylor para aproximar la varianza de una función. El porcentaje de coeficiente de variación resultante de la potencia fue: % de CV = $DT(\ln Potencia) * 100$. Los resultados se presentan en la **Tabla 8**, a continuación. Para cada antígeno, el % de CV de los valores de potencia relativa debe ser ≤ 15 %.

20 **Tabla 8:** Repetibilidad del ensayo calculada mediante los valores de potencia obtenidos con seis repeticiones de Lote 1 de vacuna Menveo.

	MenA		MenW	
	Potencia	InPotencia	Potencia	InPotencia
	valores	valores	valores	valores
Lote 1	0,766	-0,2666	0,923	-0,0801
	0,702	-0,3538	0,913	-0,0910
	0,896	-0,1098	0,938	-0,0640
	0,785	-0,2421	0,956	-0,0450
	0,701	-0,3552	0,944	-0,0576
	0,853	-0,1590	1,072	0,0695
Media	0,784		0,958	
% de CV	10,0		5,8	
	MenC		MenY	
	Potencia	InPotencia	Potencia	InPotencia
	valores	valores	valores	valores
Lote 1	0,723	-0,3243	0,869	-0,1404
	0,767	-0,2653	0,807	-0,2144
	0,807	-0,2144	0,788	-0,2383
	0,787	-0,2395	0,946	-0,0555
	0,75	-0,2877	0,925	-0,0780
	0,741	-0,2998	0,937	-0,0651
Media	0,763		0,879	
% de CV	4,0		7,9	

25 *Reproducibilidad.* El parámetro de reproducibilidad se evaluó sometiendo a ensayo tres lotes de vacunas diferentes por tres operadores en días diferentes. El operador de RC sometió a ensayo cada lote por duplicado, para cada antígeno, durante tres sesiones analíticas diferentes, mientras que los dos operadores de CC sometieron a ensayo cada lote una sola vez, para cada antígeno, durante tres sesiones analíticas diferentes. Los lotes de vacuna utilizados fueron los siguientes:

Lote 1: Fase Líquida de CRM-MenA; MenCWY liofilizado

Lote 2: Fase Líquida de CRM-MenA; MenCWY liofilizado

Lote 3: Fase líquida de CRM-MenA; MenCWY liofilizado

Los resultados se muestran en las **Tablas 9-12**, a continuación. Para cada uno de los antígenos MenC, MenW y MenY, y para cada lote de vacunas, el % de CV de 12 determinaciones de potencia relativa debe ser $\leq 20\%$. Para el antígeno MenA y para cada lote de vacuna, el % de CV de 12 determinaciones de potencia relativa debe ser $\leq 25\%$. Para cada uno de los antígenos MenC, MenW y MenY, y para cada lote de vacunas, el % de CV de 6 determinaciones de potencia relativa de los operadores de CC debe ser $\leq 20\%$. Para el antígeno MenA, y para cada lote de vacuna, el % de CV de 6 determinaciones de potencia relativa de los operadores de CC debe ser $\leq 25\%$. Para cada antígeno y para cada lote de vacuna, el ensayo t para determinar la significancia de las diferencias entre los operadores de RC/CC debe ser $\geq 0,01$.

10 **Tabla 9:** Reproducibilidad del ensayo calculada mediante los valores de potencia obtenidos sometiendo a ensayo el antígeno MenA de tres lotes diferentes de vacuna Menveo.

	Operador de RC		Operador de CCa		Operador de CCb	
Lote 1	0,823	-0,1948	0,705	-0,3496	0,691	-0,3696
	0,558	-0,5834	0,688	-0,3740	0,847	-0,1661
	0,687	-0,3754	0,957	-0,0440	0,630	-0,4620
	0,680	-0,3857				
	0,749	-0,2890				
	0,873	-0,1358				
Total	0,741		Operadores de CC	0,753		
% de CV medio	15,2		% de CV medio	15,6		
Lote 2	0,609	-0,4959	0,706	-0,3481	0,593	-0,5226
	0,603	-0,5058	0,655	-0,4231	0,916	-0,0877
	0,870	-0,1393	0,614	-0,4878	0,551	-0,5960
	1,169	0,1561				
	0,877	-0,1312				
	0,596	-0,5175				
Total	0,730		Operadores de CC	0,673		
% de CV medio	23,4		% de CV medio	18,0		
Lote 3	0,762	-0,2718	0,598	-0,5142	0,726	-0,3202
	0,595	-0,5192	0,804	-0,2182	0,870	-0,1393
	0,947	-0,0545	0,809	-0,2120	0,762	-0,2718
	1,245	0,2191				
	0,702	-0,3538				
	0,980	-0,0202				
Total	0,817		Operadores de CC	0,762		
% de CV medio	20,8		% de CV medio	13,0		

Tabla 10: Reproducibilidad del ensayo calculada mediante los valores de potencia obtenidos sometiendo a ensayo el antígeno MenC de tres lotes diferentes de vacuna Menveo.

	Operador de RC		Operador de CCa		Operador de CCb	
Lote 1	0,787	-0,2395	0,848	-0,1649	0,819	-0,1997
	0,684	-0,3798	0,719	-0,3299	0,823	-0,1948
	0,801	-0,2219	0,752	-0,2850	0,660	-0,4155
	0,777	-0,2523				
	0,727	-0,3188				
	0,773	-0,2575				
Total	0,764		Operadores de CC	0,770		

ES 2 744 471 T3

(continuación)

		Operador de RC		Operador de CCa		Operador de CCb	
% de medio	CV	7,7		% de CV medio 9,6			
Lote 2		0,730	-0,3147	0,772	-0,2588	0,802	-0,2206
		0,782	-0,2459	0,722	-0,3257	0,934	-0,0683
		0,840	-0,1744	0,894	-0,1120	0,776	-0,2536
		0,934	-0,0683				
		0,780	-0,2485				
		0,958	-0,0429				
Total		0,827		Operadores de CC	0,817		
% de medio	CV	9,9		% de CV medio 9,7			
Lote 3		0,693	-0,3667	0,784	-0,2433	0,648	-0,4339
		0,712	-0,3397	0,837	-0,1779	0,869	-0,1404
		0,731	-0,3133	0,666	-0,4065	0,768	-0,2640
		0,786	-0,2408				
		0,794	-0,2307				
		0,694	-0,3653				
Total		0,749		Operadores de CC	0,762		
% de medio	CV	9,2		% de CV medio 11,9			

Tabla 11: Reproducibilidad del ensayo calculada mediante los valores de potencia obtenidos sometiendo a ensayo el antígeno MenW de tres lotes diferentes de vacuna Menveo.

		Operador de RC		Operador de CCa		Operador de CCb	
Lote 1		1,168	0,1553	1,237	0,2127	1,103	0,0980
		1,089	0,0853	0,955	-0,0460	1,033	0,0325
		1,091	0,0871	0,890	-0,1165	1,033	0,0325
		1,146	0,1363				
		0,989	-0,0111				
		0,875	-0,1335				
Total		1,051		Operadores de CC	1,042		
% de medio	CV	10,6		% de CV medio 11,4			
Lote 2		1,115	0,1089	0,966	-0,0346	1,062	0,0602
		1,064	0,0620	1,139	0,1302	1,024	0,0237
		1,194	0,1773	1,093	0,0889	0,972	-0,0284
		1,194	0,1773				
		0,945	-0,0566				
		1,140	0,1310				
Total		1,076		Operadores de CC	1,043		
% de medio	CV	8,0		% de CV medio 6,5			
Lote 3		0,873	-0,1358	1,014	0,0139	1,111	0,1053
		1,115	0,1089	0,879	-0,1290	0,948	-0,0534
		0,961	-0,0398	0,964	-0,0367	1,041	0,0402
		1,102	0,0971				
		0,929	-0,0736				
		0,989	-0,0111				
Total		0,994		Operadores de CC	0,993		
% de medio	CV	8,5		% de CV medio 8,1			

ES 2 744 471 T3

Tabla 12: Reproducibilidad del ensayo calculada mediante los valores de potencia obtenidos sometiendo a ensayo el antígeno MenY de tres lotes diferentes de vacuna Menveo.

Lote 1	Operador de RC		Operador de CCa		Operador de CCb	
	0,900	-0,1054	0,795	-0,2294	0,915	-0,0888
	0,921	-0,0823	0,899	-0,1065	0,989	-0,0111
	0,851	-0,1613	0,787	-0,2395	0,945	-0,0566
	0,848	-0,1649				
	0,838	-0,1767				
	0,763	-0,2705				
Total	0,871		Operadores de CC		0,888	
% de CV medio	7,9		% de CV medio		9,3	
Lote 2	1,155	0,1441	0,881	-0,1267	0,959	-0,0419
	0,998	-0,0020	0,980	-0,0202	1,009	0,0090
	0,908	-0,0965	0,879	-0,1290	0,947	-0,0545
	0,722	-0,3257				
	0,819	-0,1997				
	0,925	-0,0780				
Total	0,932		Operadores de CC		0,943	
% de CV medio	11,7		% de CV medio		5,6	
Lote 3	0,755	-0,2810	0,949	-0,0523	0,927	-0,0758
	0,990	-0,0101	0,848	-0,1649	0,941	-0,0608
	0,887	-0,1199	0,944	-0,0576	0,918	-0,0856
	0,882	-0,1256				
	0,997	-0,0030				
	0,949	-0,0523				
Total	0,916		Operadores de CC		0,921	
% de CV medio	7,6		% de CV medio		4,2	

Los resultados del ensayo t para cada antígeno y lote se publican en la **Tabla 13**, a continuación.

Comparación media				
Antígeno	Lote	Diferencia*	valor p	Criterios de aceptación
MenA	1	-0,0205	0,72	≥ 0,01
	2	0,0862	0,33	
	3	0,0697	0,38	
MenC	1	-0,0195	0,78	
	2	0,0345	0,70	
	3	-0,0460	0,57	

(continuación)

Comparación media				
Antígeno	Lote	Diferencia*	valor p	Criterios de aceptación
MenW	1	0,0255	0,79	
	2	0,0869	0,21	
	3	0,0015	0,98	
MenY	1	-0,0549	0,43	
	2	-0,0469	0,66	
	3	-0,0226	0,74	
(*) los datos se evaluaron en dilución escalonada basada en logaritmos				

El ensayo t para cada grupo/antígeno/lote no mostró diferencias significativas entre las medias. El valor p en cada caso estuvo muy por encima de los criterios de aceptación definidos.

5 *Linealidad.* El parámetro de linealidad se evaluó analizando los resultados de referencia de la vacuna de los experimentos de repetibilidad. Teniendo en cuenta una transformación logarítmica natural, la respuesta de DO se expresó como una función lineal de la concentración de la vacuna mediante el procedimiento de Mínimos Cuadrados Habituales (MCH). Cada curva se evaluó como resultado de dos réplicas. Se tuvieron en cuenta al menos cinco puntos consecutivos dentro del intervalo lineal y se evaluaron los siguientes parámetros:

- Gráfico de la respuesta frente a las concentraciones de vacuna
- 10 • R cuadrado
- Valor P asociado a la regresión lineal

Los resultados se muestran en las **FIG. 2A-2F**, las **FIG. 3A-3F**, las **FIG. 4A-4F**, las **FIG. 5A-5F** y en la **Tabla 14**.

Criterios de aceptación

- El coeficiente de determinación (R cuadrado) debe ser $\geq 0,95$
- 15 • El valor p para la significación de la regresión lineal debe ser $\geq 0,05$.

Tabla 14: Regresión lineal

Antígeno	Placa	Número de puntos de concentración consecutivos	Valor p	R cuadrado
MenA	1	7	0,00	0,97
	2	7	0,00	0,99
	3	6	0,00	1,00
	4	6	0,00	0,99
	5	7	0,00	0,99
	6	7	0,00	0,99

(continuación)

Antígeno	Placa	Número de puntos de concentración consecutivos	Valor p	R cuadrado
MenC	1	7	0,00	0,99
	2	7	0,00	0,99
	3	7	0,00	0,97
	4	8	0,00	0,99
	5	7	0,00	0,98
	6	7	0,00	0,99
MenW	1	7	0,00	0,99
	2	7	0,00	0,99
	3	7	0,00	0,96
	4	6	0,00	0,98
	5	6	0,00	0,99
	6	7	0,00	0,99
MenY	1	9	0,00	0,99
	2	9	0,00	0,99
	3	9	0,00	0,99
	4	8	0,00	0,99
	5	9	0,00	0,99
	6	8	0,00	0,99

5 *Especificidad.* La especificidad del procedimiento se evaluó analizando, para cada antígeno, la competencia del anticuerpo monoclonal contra los conjugados de CRM en volumen monovalentes tanto homólogos como no homólogos. Las vacunas en volumen monovalentes se diluyeron para alcanzar, como concentración de partida, la cantidad de cada componente de vacuna contenida en el producto final farmacológico. Las diluciones posteriores fueron las siguientes: etapas de dilución 1/5 para MenA y etapas de dilución 1/2 para MenC, MenW y MenY. Los resultados se muestran en la **Tabla 15**. Los gráficos de ejemplo para MenW135 se muestran en las **FIG. 7A-7B**.

Criterios de aceptación:

- La vacuna de referencia debe tener un $R^2 \geq 0,95$.
- 10 • Las vacunas en volumen monovalentes homólogas deben tener un valor p para paralelismo $\geq 0,05$.
- Las vacunas en volumen monovalentes no homólogas deben tener un valor p para paralelismo $< 0,05$.

Tabla 15: Especificidad del ensayo evaluada mediante los valores p para el paralelismo obtenido sometiendo a ensayo las vacunas en volumen monovalentes homólogas y no homólogas.

	CRM-MenA en volumen	CRM-MenC en volumen	CRM-MenW en volumen	CRM-MenY en volumen
mAb anti-A	0,21	0,00	0,00	0,00
mAb anti-C	0,00	0,66	0,00	0,00
mAb anti-W	0,00	0,00	0,66	0,00
mAb anti-Y	0,00	0,00	0,00	0,80

15 *Precisión.* El parámetro de precisión se satisfizo cumpliendo con la linealidad, precisión y especificidad del procedimiento.

Distancia. El parámetro de intervalo se definió como la porción lineal de curvas que satisfizo los criterios de validez del análisis. Sobre la base de los resultados de linealidad, al menos cinco puntos consecutivos estaban dentro de la región

lineal.

5 **Robustez - Estabilidad del revestimiento.** Este parámetro se evaluó sometiendo a ensayo una placa/Ag en diferentes puntos temporales y haciendo competir la unión de mAb con las vacunas de referencia y ensayo del lote 1. El esquema de la placa se muestra en la Tabla 1 anterior. Después de los procedimientos de revestimiento y post-revestimiento, las placas se almacenaron a 2-8 °C y se analizaron en los siguientes puntos temporales: día 0, 3, 6, 10, 15 y 21. Los resultados del día 0 se usaron en el experimento de reproducibilidad por el operador de CCb descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la **Tabla 16**.

Criterios de aceptación:

- 10 • Para cada antígeno, el porcentaje de recuperación del valor de potencia calculado con respecto al valor de potencia en el tiempo 0 no debe exceder del 20 %. Se considera que el criterio no se cumple si este valor es superior al 20 % durante al menos dos puntos temporales de estabilidad consecutivos.

Tabla 16: Estabilidad del revestimiento evaluada por los porcentajes de recuperación de los valores de potencia en diferentes puntos temporales. Los resultados que exceden del ± 20 % están subrayados.

	MenA		MenC		MenW		MenY	
	Valor de potencia	% de recuperación	Valor de potencia	% de recuperación	Valor de potencia	% de recuperación	Valor de potencia	% de recuperación
DÍA 0	0,691		0,819		1,103		0,915	
DÍA 3	0,965	<u>140</u>	0,757	92	1,079	98	0,92	101
DÍA 6	0,736	107	0,728	89	0,979	89	0,899	98
DÍA 10	0,837	<u>121</u>	0,818	100	0,901	82	0,734	80
DÍA 15	0,778	113	0,735	90	0,984	89	0,993	109
DÍA 21	0,737	107	0,782	95	0,972	88	0,806	88

Análisis de resultados

15 **Precisión.** Los parámetros sometidos a ensayo para comprobar la precisión del procedimiento cumplieron los criterios de aceptación establecidos.

Precisión - Repetibilidad. El % de CV de los valores de potencia, determinado para los cuatro antígenos, varió del 4,0 % al 10,0 %, dentro del límite indicado del 15 % (Tabla 8).

20 **Precisión - Reproducibilidad.** El % de CV de los valores de potencia entre los operadores de RC y CC, determinado para MenA, varió del 15,2 % al 23,4 % dentro del límite indicado del 25 %; para MenC, MenW y MenY, el % de CV varió del 7,6 % al 11,7 % dentro del límite indicado del 20 %. El % de CV de los valores de potencia obtenidos por los operadores de CC para MenA varió del 13,0 % al 18,0 % dentro del límite indicado del 25 %; para MenC, MenW y MenY, el % de CV obtenido por los operadores de CC varió del 9,3 % al 11,9 % dentro del límite indicado del 20 % (**Tablas 9-12**). El valor p determinado para cada antígeno y lote varió de 0,21 a 0,98, muy por encima del límite indicado de 0,01.

25 **Linealidad.** Las curvas de referencia de la vacuna mostraron un patrón lineal en no menos de seis puntos consecutivos. El R cuadrado varió de 0,96 a 1,00, por lo que todos estaban por encima del límite seleccionado de 0,95. El valor p para someter a ensayo la importancia del modelo lineal fue inferior al límite seleccionado de 0,01.

30 **Especificidad.** Los valores p para el paralelismo calculado para las curvas de respuesta de las vacunas en volumen monovalentes no relacionadas fueron en todos los casos inferiores a 0,05, mientras que los valores p calculados para las curvas de respuesta de los monovalentes en volumen homólogos oscilaron entre 0,21 y 0,80, cumpliendo de este modo los criterios de aceptación.

Precisión. El parámetro de precisión se satisfizo cumpliendo con la linealidad, precisión y especificidad del procedimiento.

35 **Distancia.** La porción lineal de la curva de dilución se incluyó en el intervalo de concentraciones definido anteriormente.

Robustez - Estabilidad del revestimiento. Dos valores no cumplieron con el criterio del 20 %. Para el antígeno MenA, para el día 3 la recuperación en comparación con el día 0 fue del 140 % y para el día 10 la recuperación fue del 121 %. Sin embargo, puesto que estos dos puntos temporales no son consecutivos, no se observó una tendencia decreciente.

Ejemplo 3

40 Este ejemplo describe experimentos que evalúan la sensibilidad de una realización del ensayo de unión de anticuerpos *in vitro* que se usa para evaluar la inmunogenia y la potencia de un N. meningitidis tetravalente mediante monitorización de los cambios en la antigenicidad de dichas vacunas.

Este ejemplo evalúa la capacidad del ensayo para discriminar entre los lotes de vacuna patrón (potente e inmunógena) y de vacuna alterada artificialmente (sub-potente y sub-inmunógena). Con este fin, se generaron lotes de vacuna "sub potente" y "sub-inmunógena" (o lotes con principio activo inactivado) a diferentes contenidos de sacárido libre o con polisacárido des-O-acetilado.

- 5 La potencia relativa de estas muestras, que es una medida de la inmunogenia y potencia de una vacuna, se midió en comparación con un lote de vacuna Menveo de referencia.

El principio del ensayo es un ELISA competitivo, en el que un anticuerpo monoclonal específico de serogrupo bactericida se inhibe en la unión al polisacárido capsular nativo mediante la adición de la vacuna Menveo. El ensayo es un ELISA competitivo en el que la vacuna compite con anticuerpos monoclonales específicos de serogrupo bactericidas (anti-MenA, anti-MenC, anti-MenW135 y anti-MenY) en la unión a controles de sacárido capsular nativo.

Con el fin de comprobar si es posible discriminar entre una vacuna Menveo de referencia y lotes modificados según las necesidades, se aplicó el ensayo de unión de anticuerpos *in vitro* ejecutando cada ensayo por triplicado.

Procedimientos

Ensayo de potencia *in vitro*

15 Las placas de microtitulación se revistieron con el polisacárido capsular, 2,0 mcg/ml en PBS pH 7,4. Las placas se sellaron, se incubaron durante la noche a 2-8 °C, después se lavaron y se saturaron con una solución de PBS pH 7,4 que contenía gelatina porcina al 1 %, como reactivo de bloqueo, durante dos horas de incubación a 37 °C. Después, las placas se fijaron con una solución salina, que contenía polivinilpirrolidona (Serva) al 4 % y sacarosa al 10 % y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas; Después del tiempo de incubación, se extrajo la solución de fijación y las placas se dejaron secar durante la noche sobre la mesa de laboratorio.

20 En una placa de microtitulación de polipropileno diferente (NUNC) se diluyeron competidores específicos (volúmenes de vacuna Menveo o tetravalentes) con solución tampón (albúmina sérica bovina al 1 % en PBS pH 7,4 + Tween 20 al 0,01 %) con etapas de dilución con factor de dilución dos o cinco, dependiendo del antígeno (véase la **Tabla 17**). Después, el mismo volumen de anticuerpos monoclonales (mAb), utilizado a una dilución fija, se añadió en los pocillos y se permitió que interactuaran directamente con el competidor a temperatura ambiente. A los 10 minutos, la mezcla se transfirió a las placas revestidas y saturadas y se incubó durante dos horas a 37 °C. Después se lavaron las placas y se añadió a las placas un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina. El anticuerpo secundario se incubó durante 1,5 horas a 37 °C y, después del lavado, las placas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con una solución de sustrato cromógeno. Los valores de absorbancia se leyeron a la longitud de onda dual 405-620/650 nm.

El diseño de la placa utilizada para el análisis se describe en la **Tabla 17**.

Tabla 17: Diseño de placas para los antígenos MenA y MenC (columnas 1 y 12, filas A, B, G y H = blanco; filas C-F = mAb A1 o C2, a dilución fija, con adición de los competidores a 10 diluciones con factor de dilución 2 (MenC) o 10 con factor de dilución 5 (MenA), a partir de 10000 ng/ml (MenA) o 5000 ng/ml (MenC). MenWm y MenY tienen el mismo diseño de placa que MenC.

35

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12											
A																							
B																							
C													VACUNA DE REF	10000	2000	400	80	16	3,2	0,64	0,128	0,0256	0,00512
D														10000	2000	400	80	16	3,2	0,64	0,128	0,0256	0,00512
E													VACUNA DE ENSAYO	10000	2000	400	80	16	3,2	0,64	0,128	0,0256	0,00512
F														10000	2000	400	80	16	3,2	0,64	0,128	0,0256	0,00512
G																							
H																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12											
A																							
B																							
C													VACUNA DE REF	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10
D														5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10
E													VACUNA DE ENSAYO	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10
F														5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10
G																							
H																							

Preparación de muestras de conjugado con diferente nivel de polisacárido libre

Se prepararon muestras de conjugado con diferente nivel de polisacárido no conjugado, que oscilaba del 10 % al 95 %, mezclando el material conjugado en volumen con los polisacáridos hidrolizados que tenían longitudes de cadena más cortas, con adición de una cantidad diferente, que oscilaba del 10 % al 95 %. (**Tabla 18**).

5 **Tabla 18:** Concentraciones de sacárido y proteína en muestras sometidas a ensayo.

Muestra	Concentración de sacárido (mg/ml)	Contenido de proteína (µg/ml)	Sacárido/Proteína
CRM ₁₉₇ -MenA Lote GFB001A	1901,64	4523,7	0,342
CRM ₁₉₇ -MenC Lote TRMENC01	641,0	1012,9	0,63
CRM ₁₉₇ -MenW ₁₃₅ Lote GFB007W	1468,9	2181,4	0,67
CRM ₁₉₇ -MenY Lote GFB008Y	2993,9	4794,0	0,62
MenA hidrolizado Lote MS2910109	5057,0	N/A	N/A
MenC hidrolizado Lote 1 VCR	3560,0	N/A	N/A
MenW ₁₃₅ hidrolizado Lote MS030210	6755,0	N/A	N/A
MenY hidrolizado Lote MS050210	7360,0	N/A	N/A
N/A: No aplicable			

Preparación y caracterización de muestras de conjugados des-O-acetilados Los polisacáridos de los grupos A, C, W₁₃₅ e Y conjugados con CRM₁₉₇ se des-O-acetilaron mediante la adición de Na₂CO₃ 1 M (al 10 % en v/v) e incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Las muestras se neutralizaron mediante la adición de HCl acuoso 1:1 v/v y se purificaron con un filtro centrífugo MWCO Microcon de 30 kDa (Millipore), con el fin de retirar las sales utilizadas para la des-O-acetilación y se reconstituyeron en fosfato de sodio 10 mM pH 7,2 como tampón.

La des-O-acetilación completa de los polisacáridos se evaluó mediante análisis por RMN ¹H (**FIG. 8A-8D**). Para todos los polisacáridos, las señales de O-acetilo (OAc) desaparecieron y se generó Acetato libre (Acetato) después del tratamiento básico (véase la ventana espectral 2,5÷1,5 ppm en el cuadro de la derecha). Como consecuencia de la retirada de O-acetilación, las señales de NAc se desplazaron ligeramente y, además, se resolvieron en un pico único para CRM₁₉₇-MenC.

El contenido de sacárido del conjugado A meningocócico se estimó mediante una dosis hecha en el laboratorio de manosamina-6-fosfato usando el análisis por HPLC-Pad. El contenido de sacárido de las muestras de C, W₁₃₅ e Y se estimó mediante el ensayo colorimétrico de Svennerhom. El contenido de proteína de todas las muestras se estimó mediante un ensayo de kit comercial MicroBCA colorimétrico (Pierce), como se publica en la **Tabla 19**.

20 **Tabla 19:** Contenido de sacárido y proteína de muestras des-O-acetiladas.

Muestra	Contenido de sacárido (µg/ml)	Contenido de proteína (µg/ml)	Sacárido/Proteína
CRM ₁₉₇ -MenA	319,7	985,8	0,32
CRM ₁₉₇ -MenC	450,9	887,0	0,51
CRM ₁₉₇ -MenW ₁₃₅	637,6	776,7	0,82
CRM ₁₉₇ -MenY	876,2	1190,9	0,74

Además, los conjugados des-O-acetilados se caracterizaron por análisis SDS-Page (**FIG. 9 y 10**).

Resultados

Para cada antígeno, se prepararon y se sometieron a ensayo 5 lotes de vacunas monovalentes, a diferentes porcentajes de sacárido libre en la presentación de fármaco final (combinación tetravalente MenACW₁₃₅Y) para comprobar la sensibilidad del rendimiento del ensayo. El contenido de sacárido libre añadido a cada volumen monovalente líquido (10 %, 25 %, 50 %, 75 % y 95 %) dio como resultado un aumento de la cantidad total inicialmente presente en cada muestra en volumen.

La **Tabla 20** publica el contenido de sacárido libre, expresado como porcentaje del sacárido total, presente en cada producto utilizado para generar los lotes alterados y la cantidad presente en la vacuna de referencia.

Tabla 20: Porcentajes de sacárido libre en las muestras líquidas monovalentes y en los lotes de referencia.

	Contenido de sacárido libre (%)			
	MenA	MenC	MenW	MenY
MenA-CRM₁₉₇ en volumen (Lote GFB001A)	<4,6			
MenA-CRM ₁₉₇ Lio (Lote de REF 039011)	<5			
MenC-CRM₁₉₇ en volumen (Lote TRMENC01)		<1		
MenCWY-CRM ₁₉₇ (Lote de REF 091201)		<10		
MenW-CRM₁₉₇ en volumen (Lote GFB007W)			4,8	
MenCWY-CRM ₁₉₇ (Lote de REF 091201)			<12	
MenY-CRM₁₉₇ en volumen (Lote GFB008Y)				2,1
MenCWY-CRM ₁₉₇ (Lote de REF 091201)				<13

5 Las especificaciones límite para el contenido de sacárido libre en el medicamento, para los cuatro conjugados, son los siguientes:

- <10 % para MenA;
- <17 % para MenC, MenW135 y MenY.

Los valores de potencia relativa determinados en cada ensayo se compararon con el nivel de corte asignado a cada antígeno (véase la **Tabla 21**).

10 **Tabla 21:** Valores de corte de potencia relativa para los cuatro antígenos

Antígeno	3 sigma LL
MenA	0,421
MenC	0,495
MenW	0,690
MenY	0,679

Cada muestra en volumen que se ha de someter a ensayo se preparó combinando el volumen alterado correspondiente con las muestras en volumen monovalentes de los otros conjugados, para obtener el medicamento final (conjugado de polisacárido MenACW135Y-CRM).

15 Moreover, una muestra des-O-acetilada para cada conjugado se preparó con el objetivo de investigar el impacto del estado de acetilación del polisacárido sobre las lecturas de potencia *in vitro*.

Todas las muestras se analizaron por triplicado, usando el diseño de placa descrito en la **Tabla 17**. El lote de vacuna Menveo utilizado como referencia es un lote liofilizado de MenA reconstituido con el lote de MenCW135Y líquido.

Los resultados que se refieren a muestras que contienen diferentes grados de sacárido libre se muestran en las **FIG. 11-14**.

20 Los resultados del medicamento con las muestras des-O-acetiladas se muestran en la **FIG. 15**.

25 La evaluación de la potencia relativa se obtuvo usando una hoja de Excel validada. Los valores de potencia se calcularon usando el Procedimiento de Línea Paralela como se describe en la Farmacopea Europea 6.0. De acuerdo con este modelo, la relación entre la transformación logarítmica de la dosis y la respuesta (DO o una transformación) puede representarse como una línea recta, sobre el intervalo de dosis utilizadas; el modelo se basa en el supuesto de paralelismo entre la preparación desconocida y la preparación patrón. La distancia horizontal entre las dos líneas es la estimación de la potencia de la preparación desconocida con respecto al patrón.

En particular, después de elegir el intervalo lineal de cada curva, la potencia relativa se calcula como:

$$Potencia\ relativa = anti\ log\left(-\frac{Intersección_{MUE} - Intersección_{PAT}}{b_{COM}}\right)$$

donde:

*b*COM es la pendiente común

*Intersección*MUE es la intersección de la curva Muestra, suponiendo una pendiente común

*Intersección*PAT es la intersección de la curva patrón, suponiendo una pendiente común

5 Los criterios de aceptación para la discriminación de placas no válidas son:

- R cuadrado de las curvas de vacuna referencia y de ensayo: $\geq 0,95$
- valor p para no paralelismo: $\geq 0,05$

Análisis y conclusión

Muestras con diferente contenido de sacárido libre

10 MenA

Todas las muestras analizadas, con adición de cantidades crecientes de sacárido libre, dieron como resultado placas no válidas (no se cumplió R^2 y/o el valor p para el no paralelismo) con la excepción de dos réplicas para la muestra con adición de un 10 % de sacárido libre.

15 Los resultados obtenidos indican que este ensayo de inmunogenia y potencia *in vitro* discrimina entre el lote de referencia y las muestras con un mayor contenido de sacárido libre con respecto a las especificaciones establecidas (adición del 10 % al 95 %) (véase la **FIG. 11** y la **Tabla 21**; especificación de autorización para el contenido de sacárido libre en el medicamento final $<10\%$, contenido de sacárido libre en volumen $<4,6\%$, valor de potencia de corte más bajo = 0,421).

MenC

20 Una muestra con una adición de sacárido libre del 50 % y todas las muestras con un 75 % y 95 % de sacárido libre añadido (contenido de sacárido libre en volumen $<1\%$) proporcionaron placas no válidas (no se cumplieron R^2 y/o el valor de p para el no paralelismo).

25 Los valores medios de potencia para las muestras añadidas con un 25 % y un 50 % de sacárido libre estuvieron en el intervalo de 0,289-0,489, por debajo del límite de corte inferior (0,495). De acuerdo con las especificaciones de autorización (contenido de sacárido libre $<17\%$), la muestra con un 10 % de sacárido libre añadido mostró una potencia relativa media de 0,596 (**FIG. 5**), en el intervalo de aceptación por encima del valor de corte de 0,495.

Los resultados obtenidos indican que este ensayo de inmunogenia y potencia *in vitro* discrimina entre el lote de referencia y las muestras con un contenido añadido de sacárido libre, del 25 % al 95 %.

MenW135

30 Las muestras que contenían un 95 % de sacárido libre proporcionaron placas no válidas (no se cumplió R^2 y/o el valor p para el no paralelismo).

Los resultados obtenidos mostraron una tendencia decreciente de los valores de potencia en el intervalo del 10 % al 95 % de sacárido libre añadido (**FIG. 13**). Las muestras con un 10 % y un 25 % de sacárido libre añadido mostraron valores medios de potencia relativa por encima del límite de corte inferior de 0,690 (0,899 y 0,780, respectivamente).

35 Estos resultados indican que las propiedades antigénicas de estas muestras alteradas se mantienen aceptables con las especificaciones de inmunogenia y potencia actuales de hasta un 25 % de sacárido libre añadido, incluso si están fuera de la especificación de autorización para el contenido de sacárido libre ($<17\%$).

MenY

40 Las muestras que contenían un 95 % de sacárido libre proporcionaron placas no válidas (no se cumplió R^2 y/o el valor p para el no paralelismo).

De manera similar al antígeno MenW135, los valores de potencia determinados mostraron una tendencia decreciente en el intervalo del 10 % al 95 % (**FIG. 7**) y las muestras con un 10 % y un 25 % de sacárido libre añadido revelaron un valor de potencia relativa medio por encima del valor de corte más bajo de 0,679 (0,850 y 0,717, respectivamente).

45 Estos resultados indican que, como se observó para MenW135, las propiedades antigénicas de estas muestras alteradas se mantienen aceptables con las especificaciones de inmunogenia y potencia actuales de hasta un 25 % de sacárido libre añadido, incluso si están fuera del límite de la especificación de autorización para el contenido de sacárido libre ($<17\%$).

Muestras des-O-acetiladas

La muestra de MenA des-O-acetilado dio como resultado valores de potencia cercanos a 0, mostrando una diferencia relevante en las propiedades antigénicas en comparación con la vacuna de referencia, confirmando de este modo la importancia bien conocida del estado de acetilación de la molécula en la generación de una respuesta inmunitaria protectora y bactericida (**FIG. 15**) (Berry DS, y col. 2002, IAI 70: 3707-3713).

- 5 No se detectaron diferencias evidentes en los valores de potencia para las muestras de MenC, MenW135 y MenY des-O-acetilados con respecto a la vacuna Menveo de referencia (valor de potencia ~ 1), lo que indica que, para estos serogrupos, el epítipo funcional detectado por anticuerpos monoclonales no se ve afectado por el estado de acetilación del polisacárido.

- 10 Además, este resultado está en línea con la referencia publicada que indica que el grupo O-acetilo no es relevante para la protección en los serogrupos C, W135 e Y (Gudlavalleti SK, y col. 2007, *Vaccine* 25: 7972-7980).

Referencias

- Berry DS, Lynn F, Lee CH, Frasch CE, Bash MC.: *Effect of O acetylation of Neisseria meningitidis serogroup A capsular polysaccharide on development of functional immune responses; Infection and Immunity*, 2002, 70 (7), 3707-13.
- 15 Gudlavalleti SK, Lee CH, Norris SE, Paul-Satyaseela M, Vann WF, Frasch CE. *Comparison of Neisseria meningitidis serogroup W135 polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines made by periodate activation of O-acetylated, non-O-acetylated and chemically de-O-acetylated polysaccharide. Vaccine*, 25 (46), 7972-7980 (2007).
- Fusco PC, Farley EK, Huang CH, Moore S, Michon F. *Protective meningococcal capsular polysaccharide epitopes and the role of O acetylation. Clin Vaccine Immunol*, 14 (5), 577-584 (2007).

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de evaluación de la potencia de una vacuna de sacárido capsular meningocócico que comprende:

- (a) poner en contacto la vacuna de sacárido capsular meningocócico con un anticuerpo bactericida y un sacárido de control, en el que la vacuna de sacárido capsular meningocócico compite con el sacárido de control por la unión al anticuerpo bactericida;
- (b) evaluar la potencia de la vacuna de sacárido capsular meningocócico midiendo de la unión del anticuerpo bactericida al sacárido de control;

en el que la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende al menos dos sacáridos seleccionados entre (i) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo A que es un homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato con unión ($\alpha 1 \rightarrow 6$), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4, (ii) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C que es un homopolímero de ácido siálico con unión ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (ácido N-acetil neuramínico ("NeuNAc"), (iii) un sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 que es un polímero de unidades disacarídicas de ácido siálico-galactosa escrito como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Gal- α -(1 \rightarrow , y (iv) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y que es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto porque la unidad de repetición disacarídica incluye glucosa en lugar de galactosa y la estructura del serogrupo Y se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Glc- α -(1 \rightarrow , y en el que el anticuerpo bactericida se une a uno de los al menos dos sacáridos y al sacárido de control, y en el que la potencia se evalúa comparando la curva de inhibición con una curva de inhibición de referencia para un sacárido capsular de referencia del mismo serogrupo de potencia conocida.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los al menos dos sacáridos son (i) y (ii) o (ii) y (iv); o en el que la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende los cuatro sacáridos (i)-(iv).

3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los sacáridos se conjugan con una proteína transportadora seleccionada entre el grupo que consiste en: toxoide diftérico; toxoide tetánico; CRM197; y proteína D de *H. influenzae*.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la vacuna de sacárido capsular meningocócico (a) se formula para inyección intramuscular; (b) comprende adicionalmente un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio; (c) no incluye ningún material mercurial; y/o (d) comprende adicionalmente un alcohol de azúcar o sacarosa.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende adicionalmente uno o más de los siguientes antígenos adicionales: (i) un sacárido capsular conjugado de *Haemophilus influenzae* de tipo B; (ii) un sacárido capsular conjugado de *Streptococcus pneumoniae*; (iii) un antígeno proteínico de *N. meningitidis* serogrupo B; (iv) un antígeno diftérico; (v) un antígeno tetánico; (vi) un antígeno pertúsico celular o de célula completa; (vii) uno o más antígenos pertúsicos acelulares; (viii) un antígeno del virus de la hepatitis B; (ix) uno o más antígenos de poliovirus; y (x) un antígeno del virus de la hepatitis A.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el sacárido de control se selecciona entre el grupo que consiste en: un polisacárido capsular nativo del mismo serogrupo que uno de los al menos dos sacáridos, un oligosacárido capsular del mismo serogrupo que uno de los al menos dos sacáridos, un sacárido sintético, un conjugado de cualquiera de los anteriores, o una combinación de uno o más de los anteriores, por ejemplo, el sacárido de control es el conjugado del oligosacárido capsular y el sacárido de control es de uno de los serogrupos A, Y, C o W135.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la medición de la unión incluye la adición de un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo bactericida en el que el anticuerpo secundario se conjuga con una enzima que cataliza una reacción detectable, por ejemplo, la enzima es fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la medición de la unión incluye diluir en serie la vacuna de sacárido capsular meningocócico, por ejemplo, la dilución en serie incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco puntos en una porción lineal de una curva de inhibición calculada con mediciones de la dilución en serie, en la que la dilución en serie es una serie de diluciones con factor de dilución 2 o 3 si el sacárido de control es de los serogrupos C, Y o W135, o una serie de diluciones con factor de dilución 5 si el sacárido de control es del serogrupo A.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la dilución en serie es en una placa de pocillos múltiples, por ejemplo, una placa de microtitulación de 96 pocillos o una placa de microtitulación de 384 pocillos y, opcionalmente, en el que el sacárido de control se une a una superficie de al menos un pocillo de la placa de pocillos múltiples.

10. Un kit para evaluar la potencia de una vacuna de sacárido capsular meningocócico que comprende:

- (a) una placa de pocillos múltiples;

(b) sacáridos de control para unirse a una superficie de los pocillos, sacáridos de control que son sacáridos capsulares de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 e Y, y que están en forma de polisacáridos capsulares nativos obtenidos de una bacteria meningocócica del serogrupo requisito, oligosacáridos capsulares, sacáridos sintéticos o conjugados de cualquiera de los anteriores; y

5 (c) anticuerpos bactericidas, cada uno de los cuales se une a uno de los sacáridos de control y uno de los sacáridos capsulares en la vacuna,

en el que la vacuna de sacárido capsular meningocócico comprende (i) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo A que es un homopolímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato con unión ($\alpha 1 \rightarrow 6$), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4, (ii) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C que es un homopolímero de ácido siálico con unión ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (ácido N-acetil neuramínico ("NeuNAc")), (iii) un sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 que es un polímero de unidades disacarídicas de ácido siálico-galactosa escrito como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Gal- α -(1 \rightarrow), y (iv) un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y que es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto porque la unidad de repetición disacarídica incluye glucosa en lugar de galactosa y la estructura del serogrupo Y se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Glc- α -(1 \rightarrow), y en el que los sacáridos de control competirán con la vacuna por la unión al anticuerpo bactericida.

11. El kit de la reivindicación 10 que comprende adicionalmente un tampón de dilución de anticuerpo bactericida, en el que el tampón de dilución de anticuerpo bactericida incluye opcionalmente un detergente (por ejemplo, TWEEN 20 (TM)) y/o que comprende adicionalmente un tampón de dilución de vacuna.

12. El kit de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que los sacáridos de control son los conjugados de los oligosacáridos capsulares y los sacáridos de control son de los serogrupos A, Y, C y W135.

13. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el anticuerpo bactericida se almacena a -20 °C en un tampón que incluye una proteína de albúmina sérica.

FIG. 1A

Inhibición de mAb anti-A con oligo A revestimiento de Menveo de PS

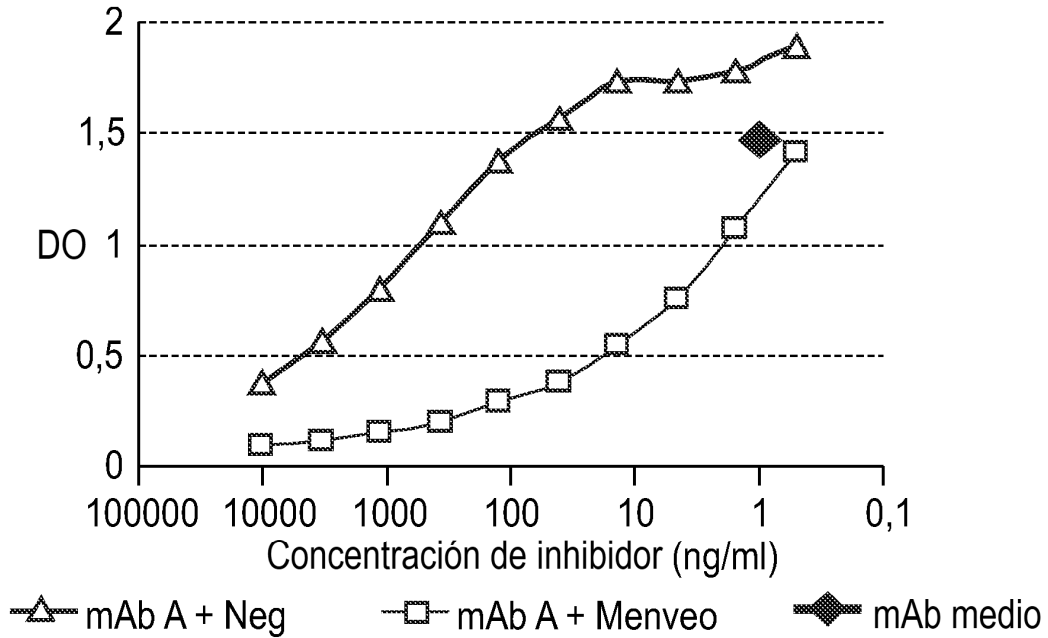


FIG. 1B

Inhibición de mAb anti-A con oligo A revestimiento de Menveo de CONJ

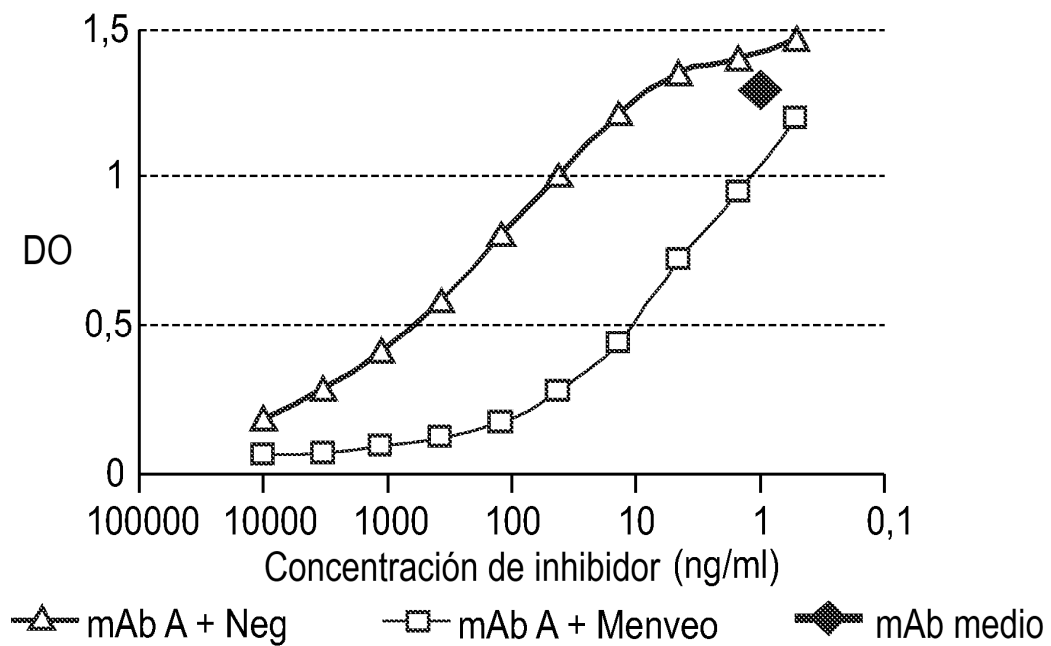


FIG. 1C

Inhibición de mAb anti-C con oligo C y revestimiento de Menveo de PS

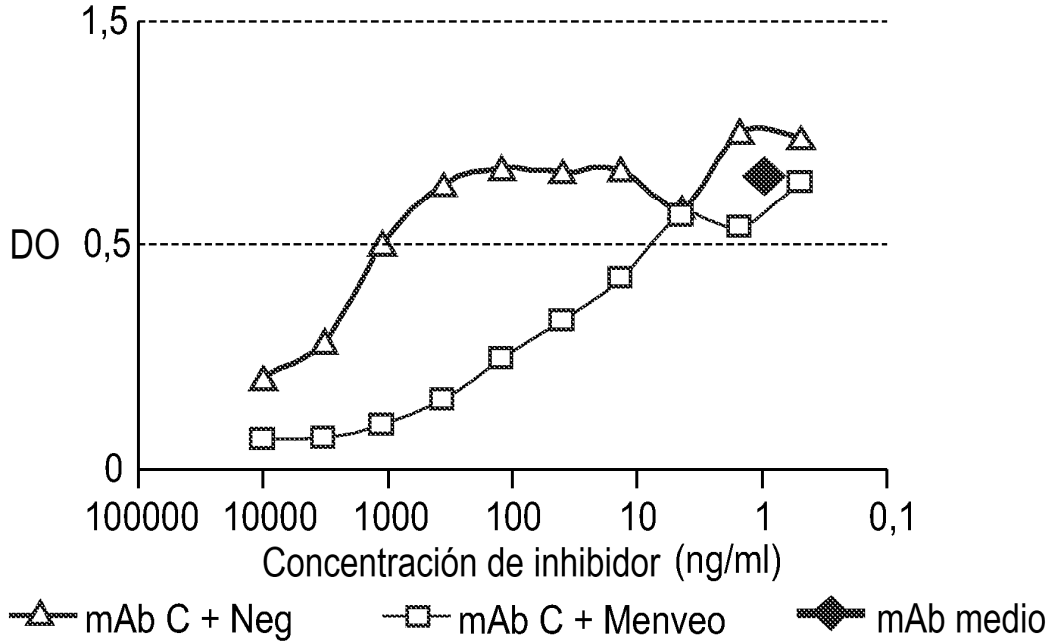


FIG. 1D

Inhibición de mAb anti-C con oligo C y revestimiento de Menveo de CONJ

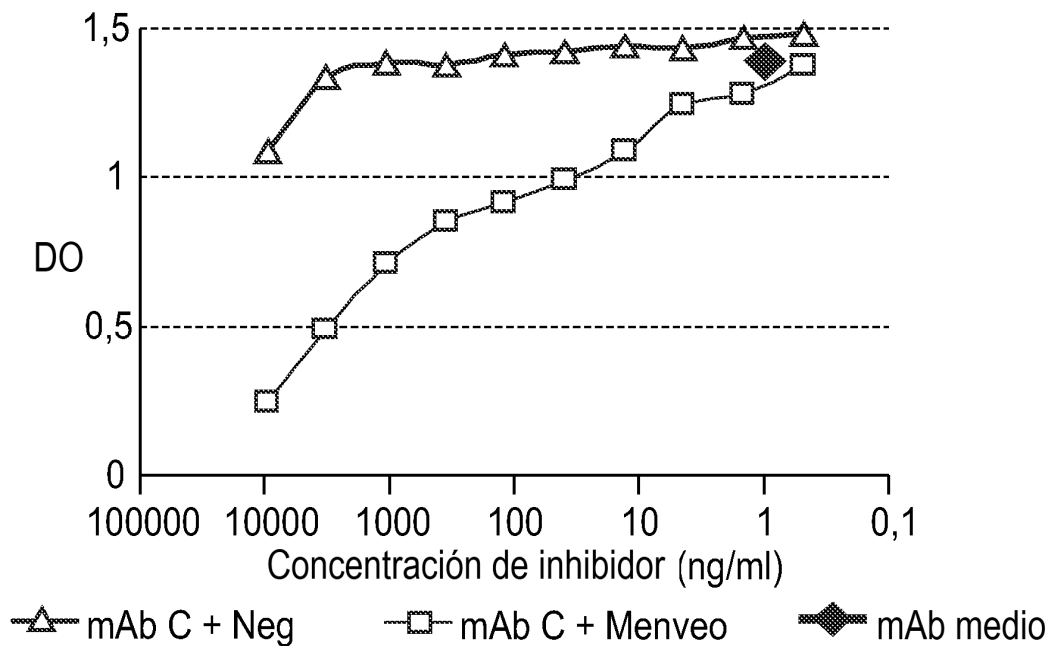


FIG. 1E

Inhibición de mAb anti-W con oligo W y revestimiento de Menveo de PS

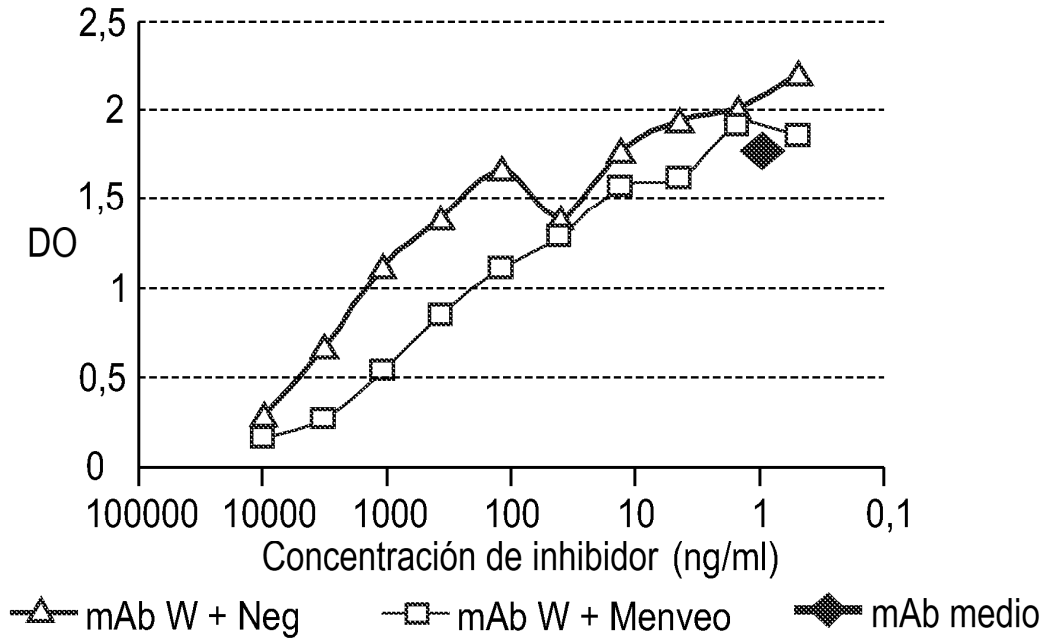


FIG. 1F

Inhibición de mAb anti-W con oligo W y revestimiento de Menveo de CONJ

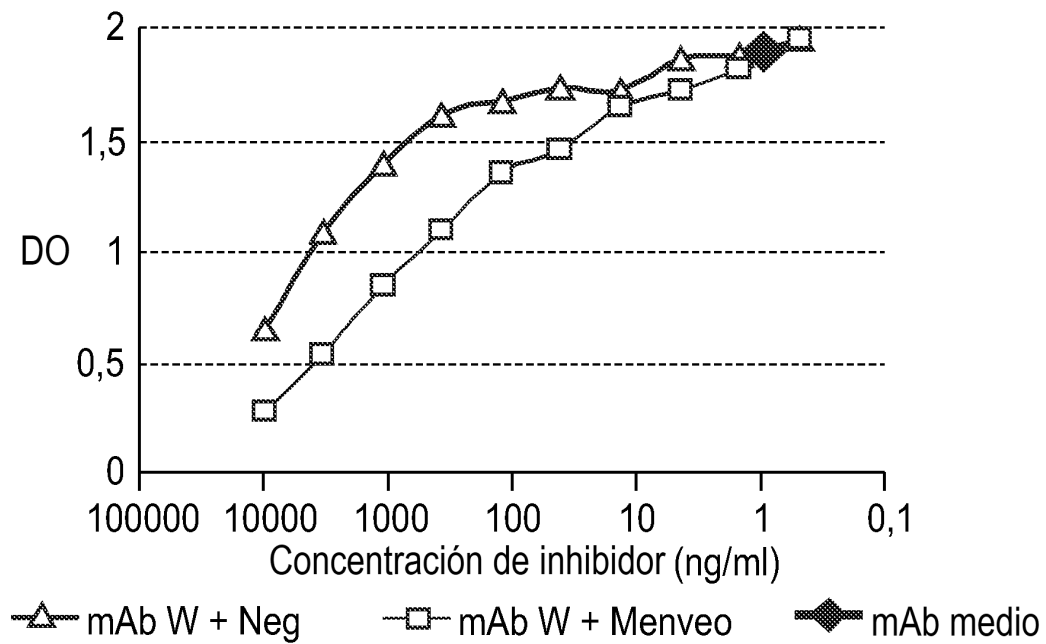


FIG. 1G

Inhibición de mAb anti-Y con oligo Y y revestimiento de Menveo de PS

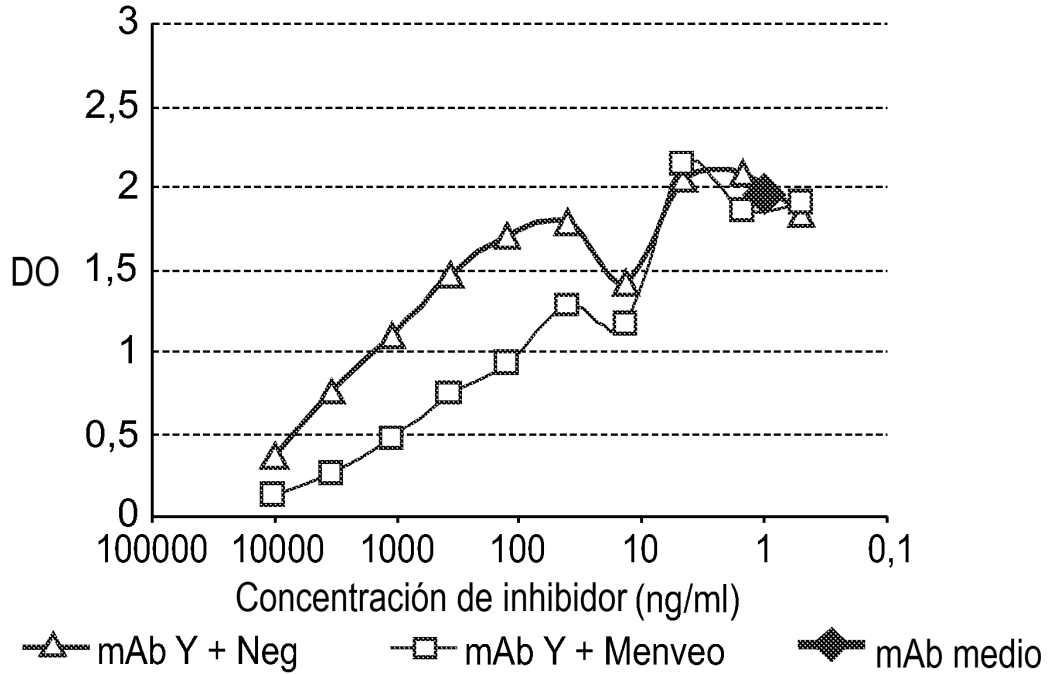


FIG. 1H

Inhibición de mAb anti-Y con oligo Y y revestimiento de Menveo de CONJ

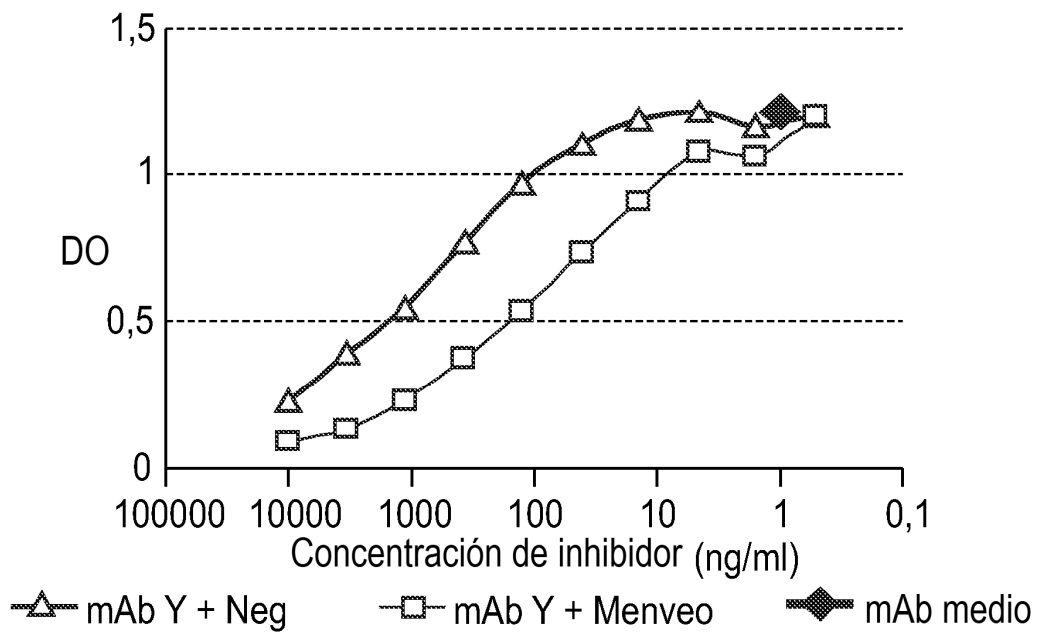


FIG. 2A

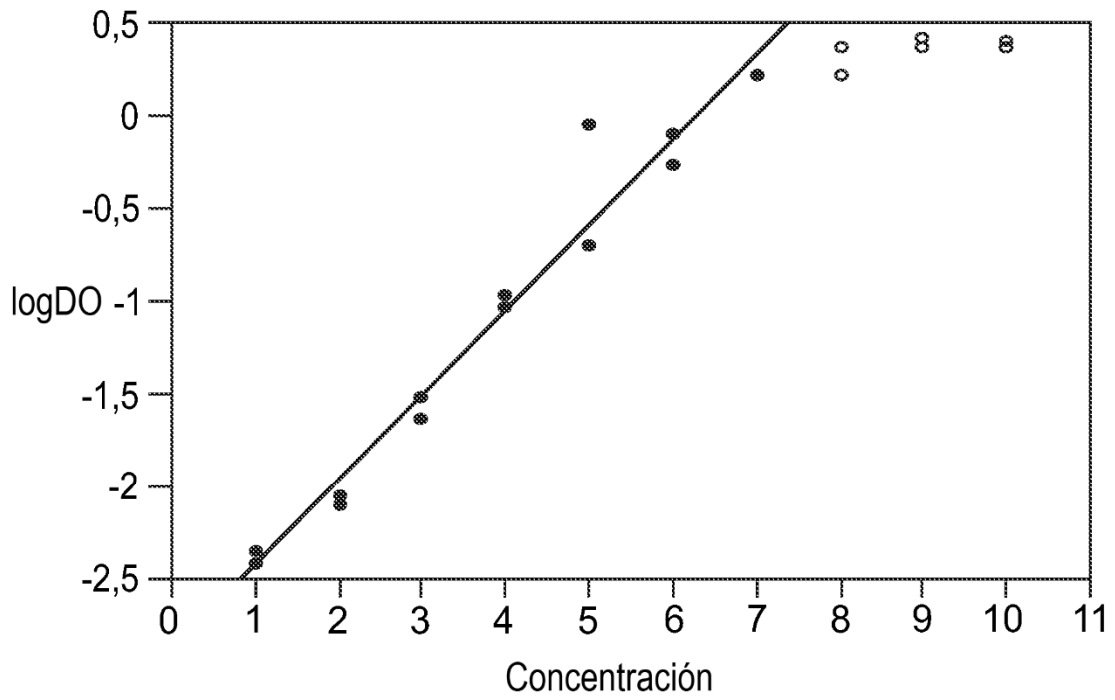


FIG. 2B

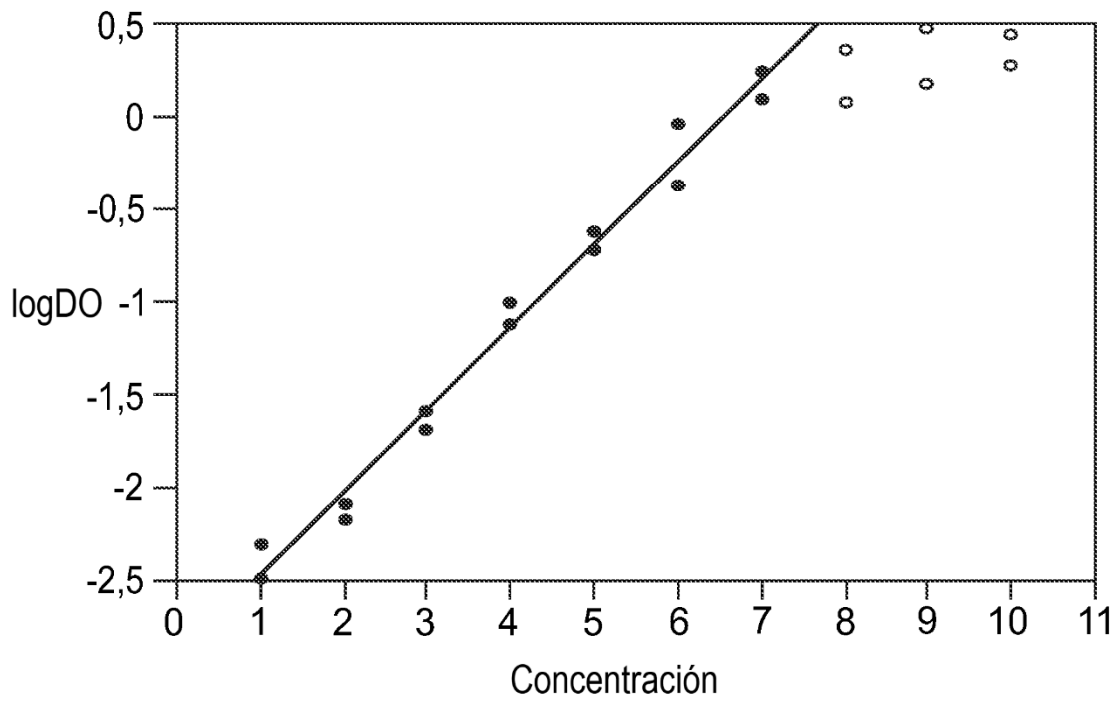


FIG. 2C

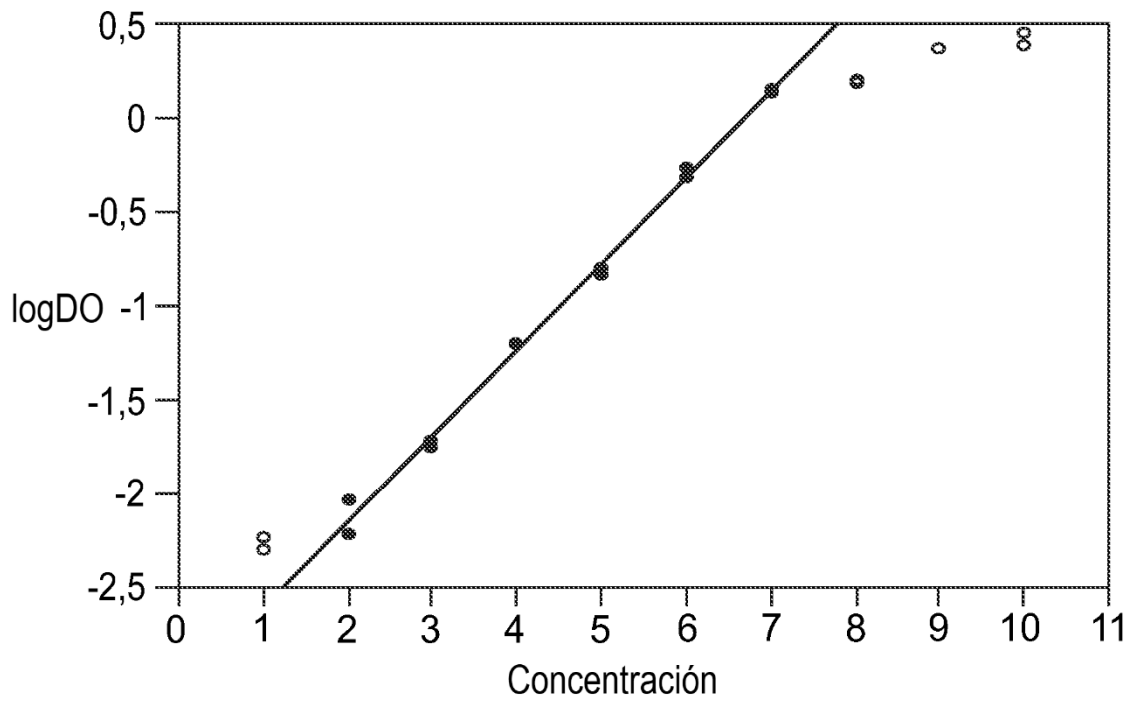


FIG. 2D

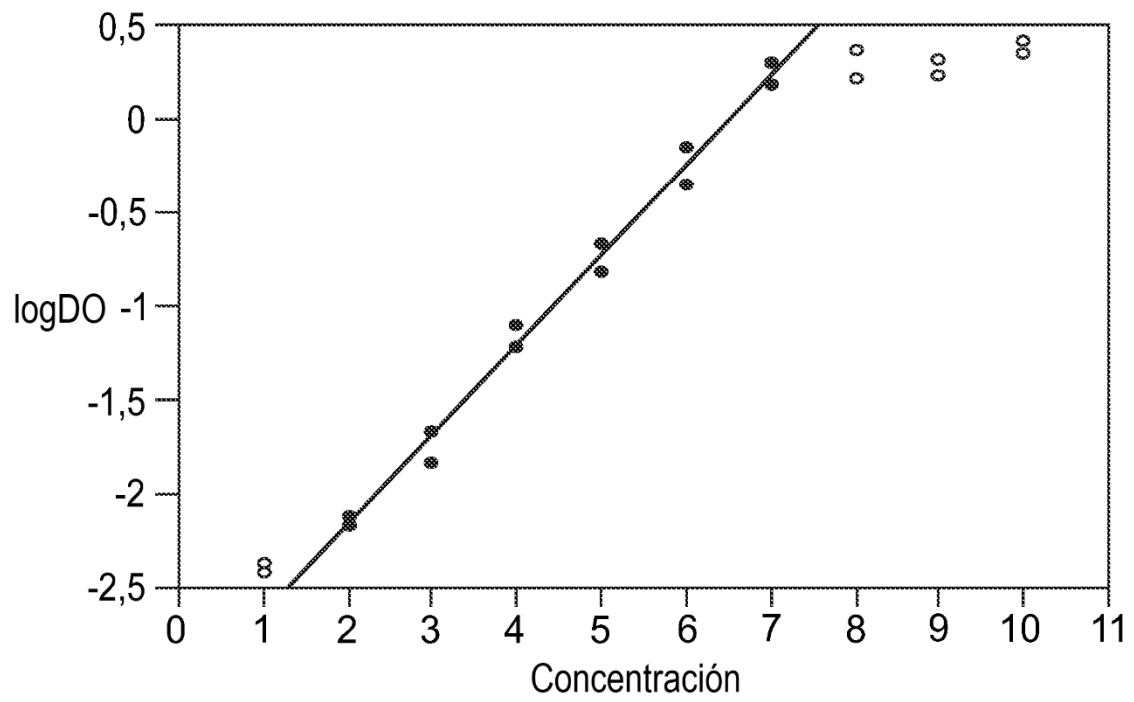


FIG. 2E

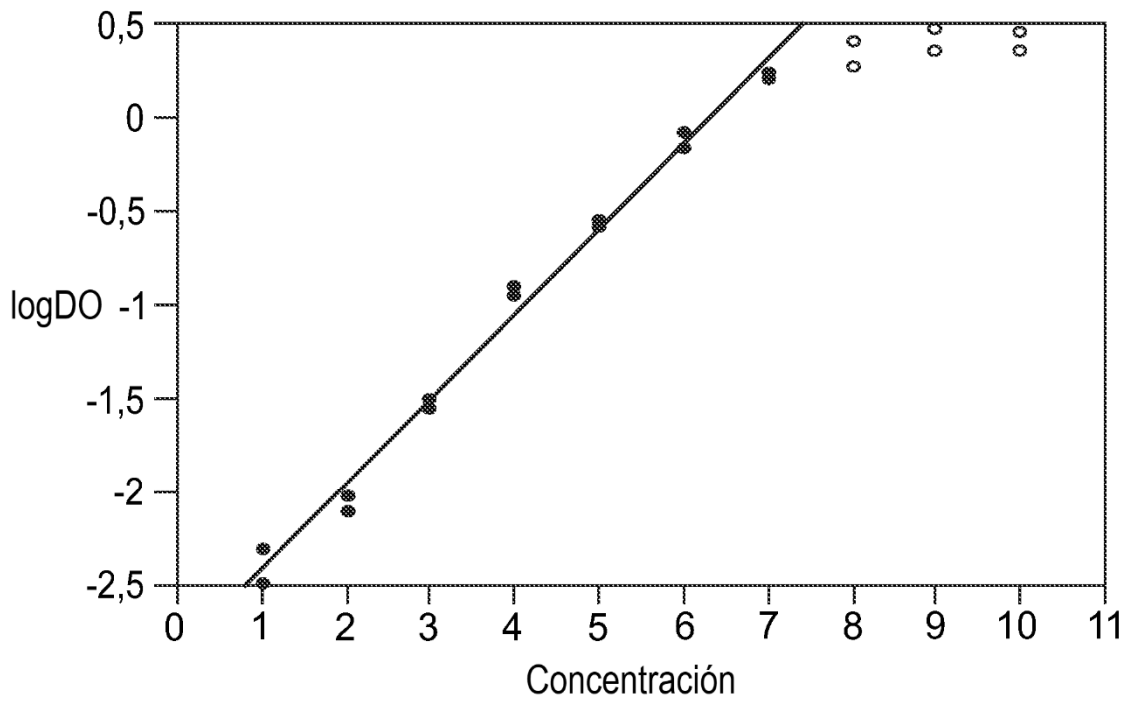


FIG. 2F

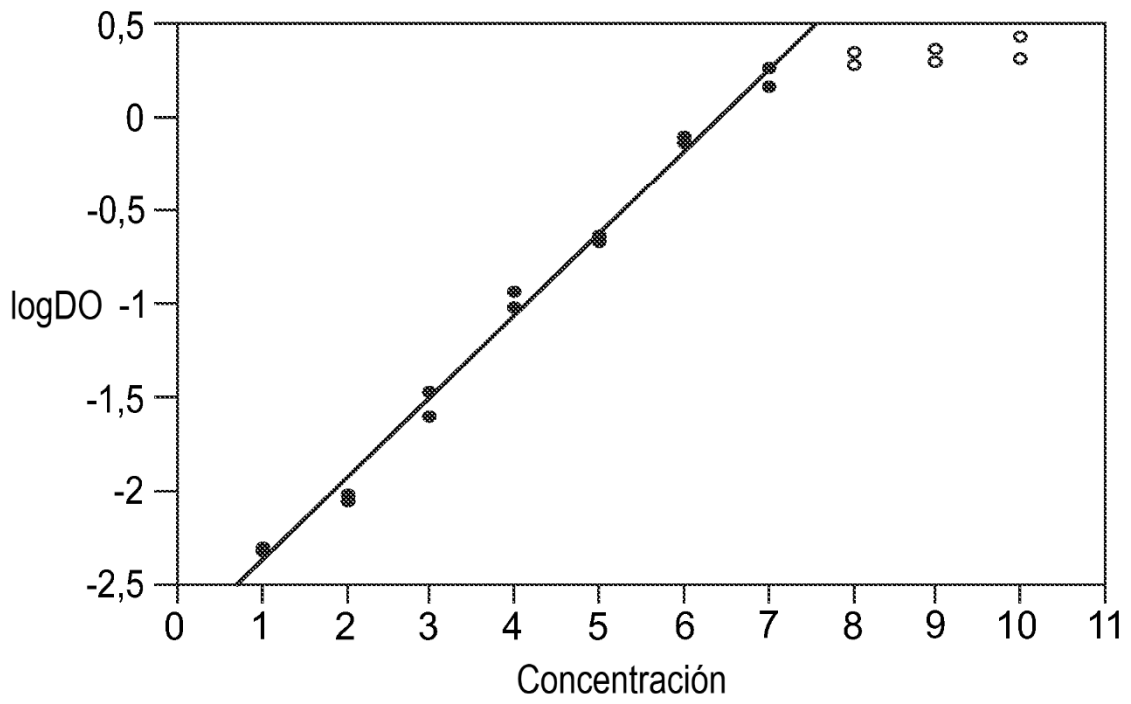


FIG. 3A

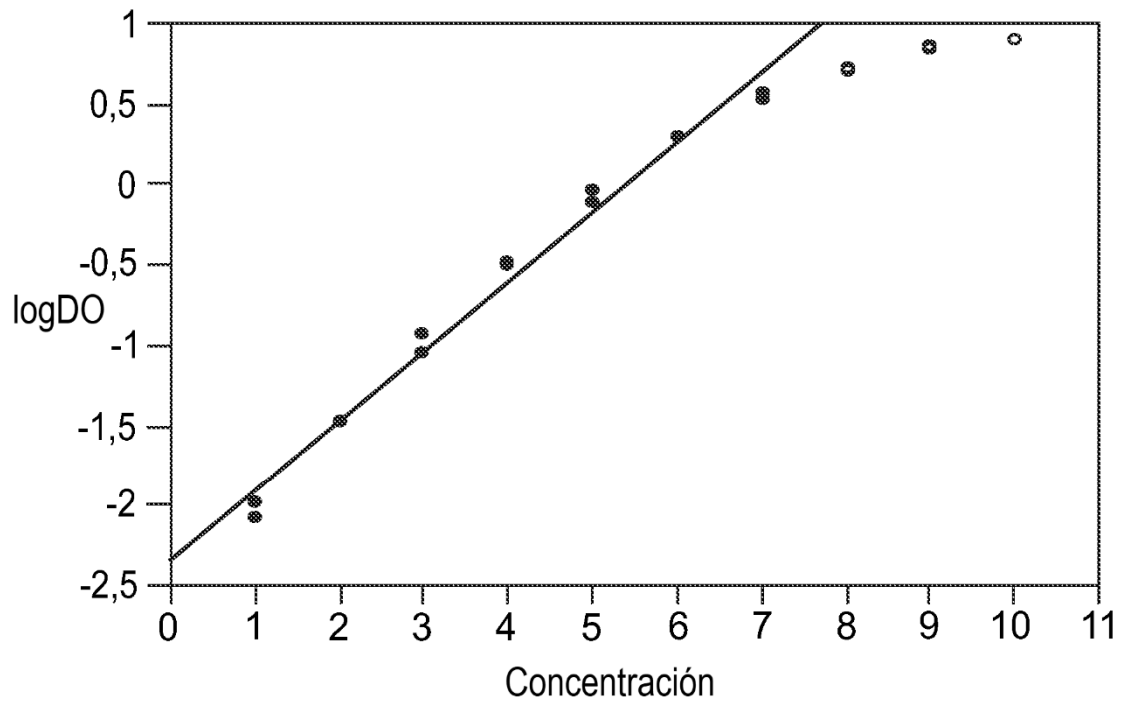


FIG. 3B

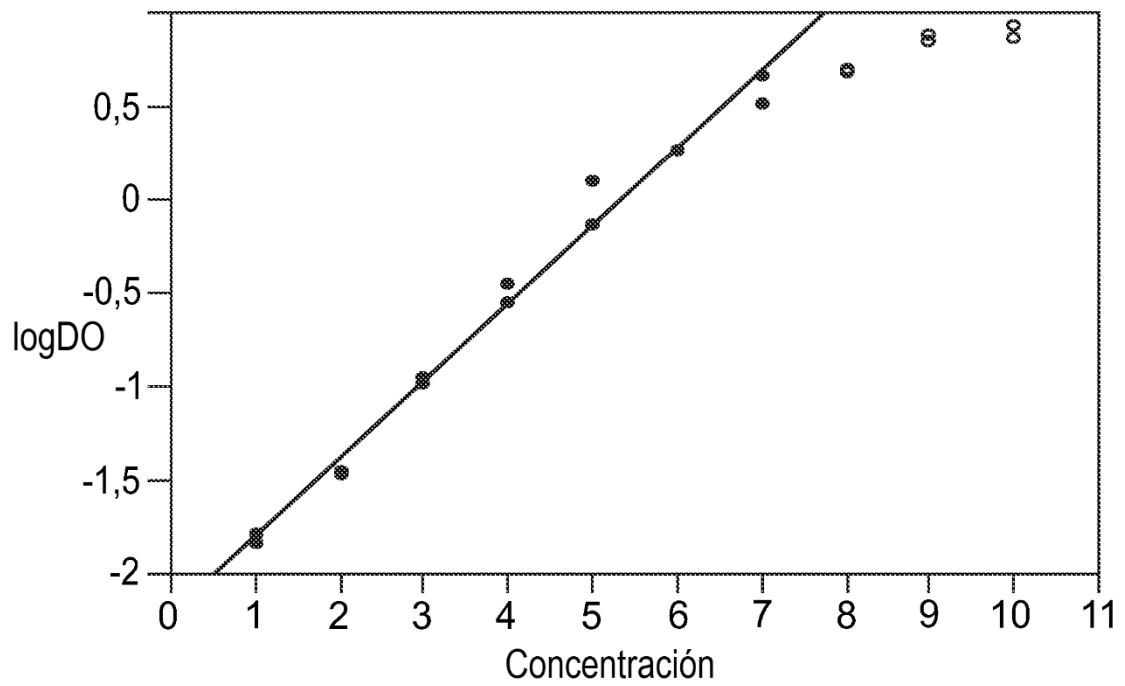


FIG. 3C

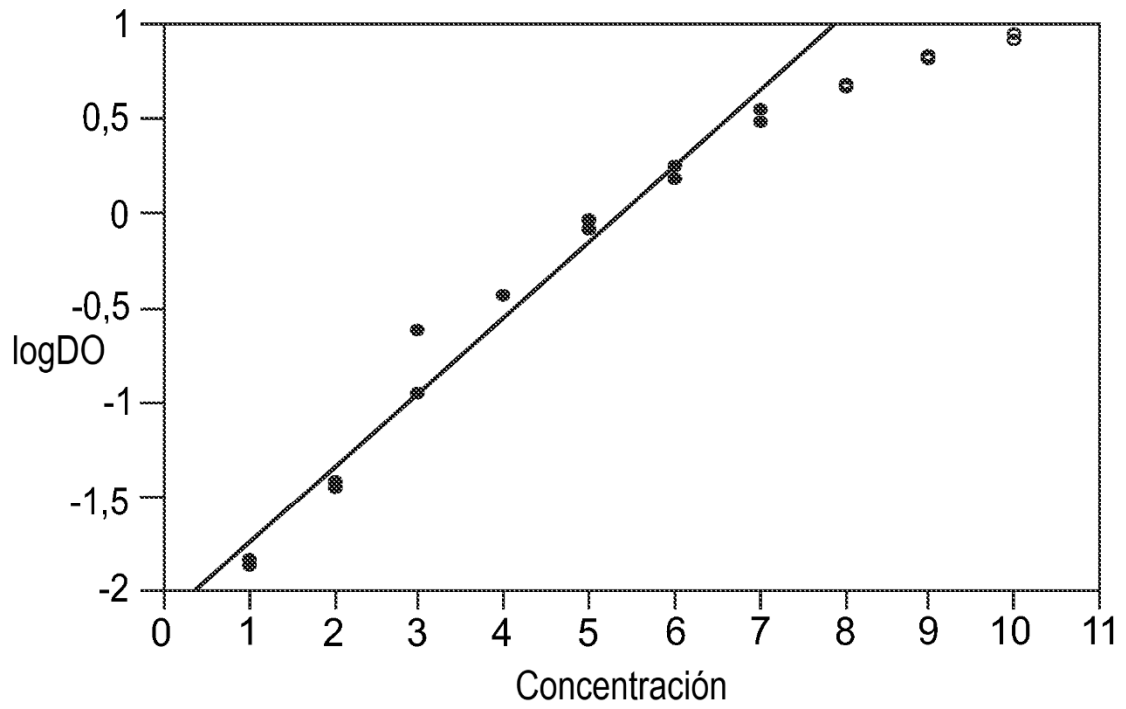


FIG. 3D

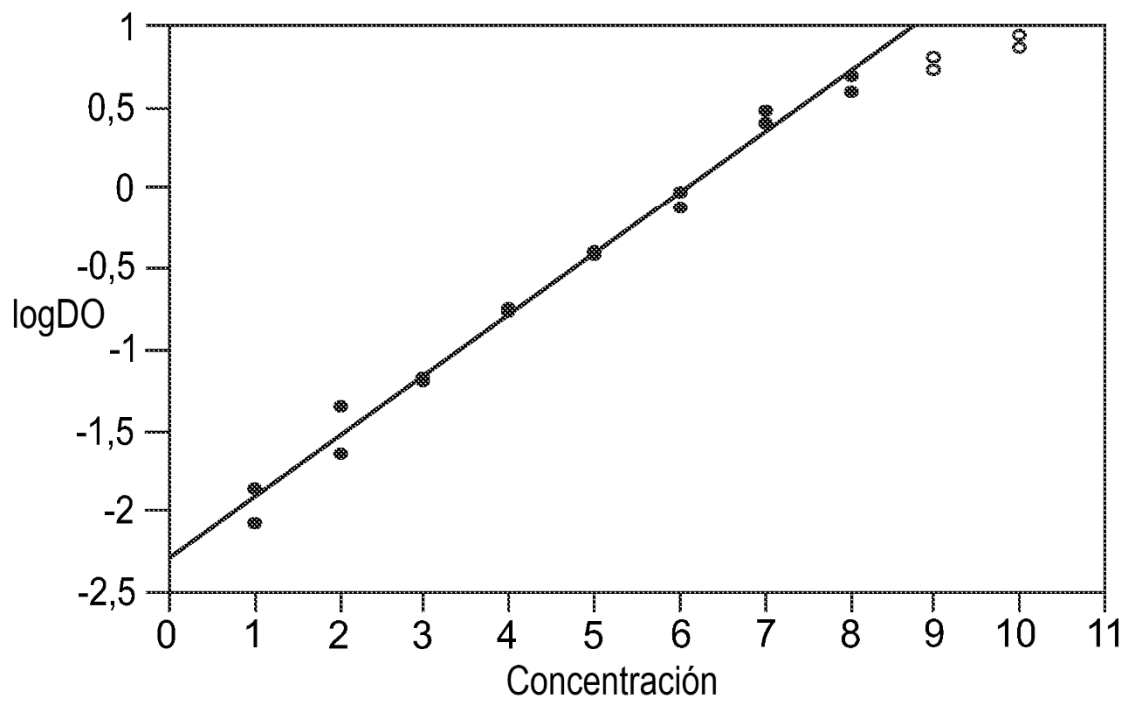


FIG. 3E

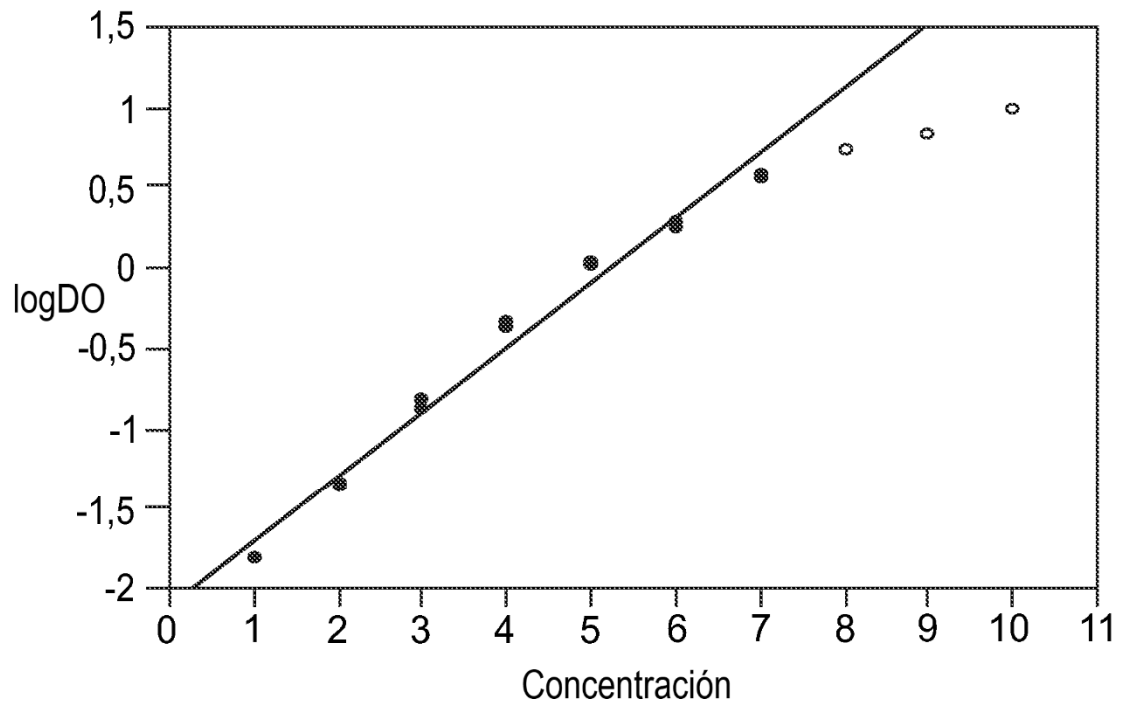


FIG. 3F

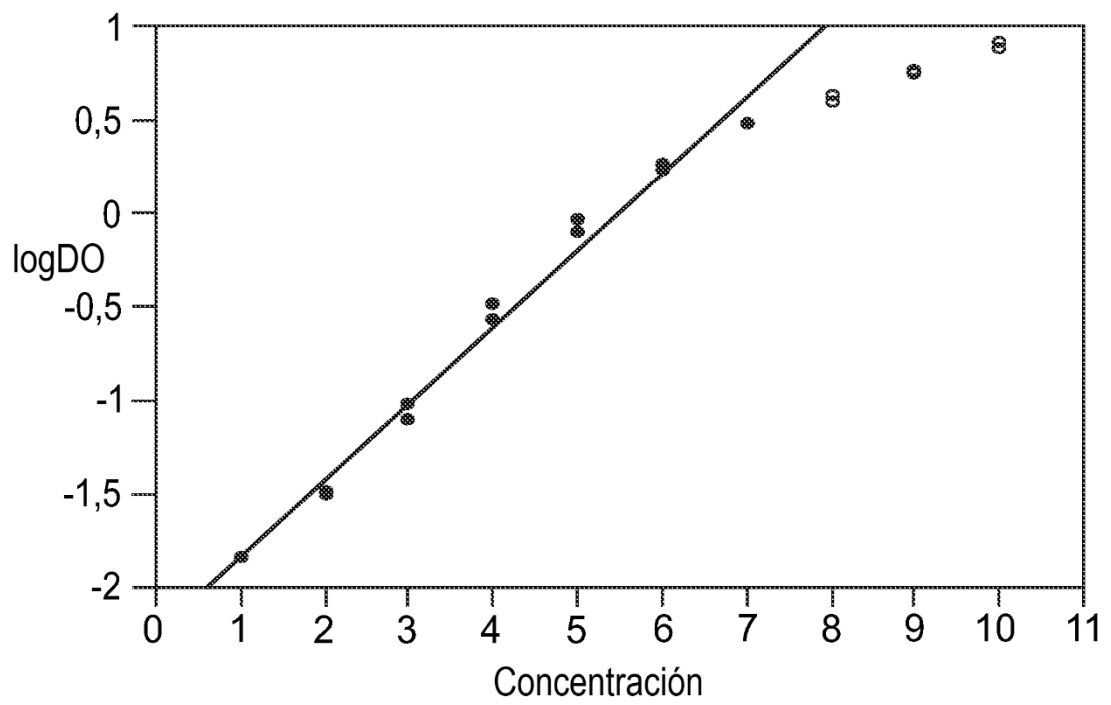


FIG. 4A

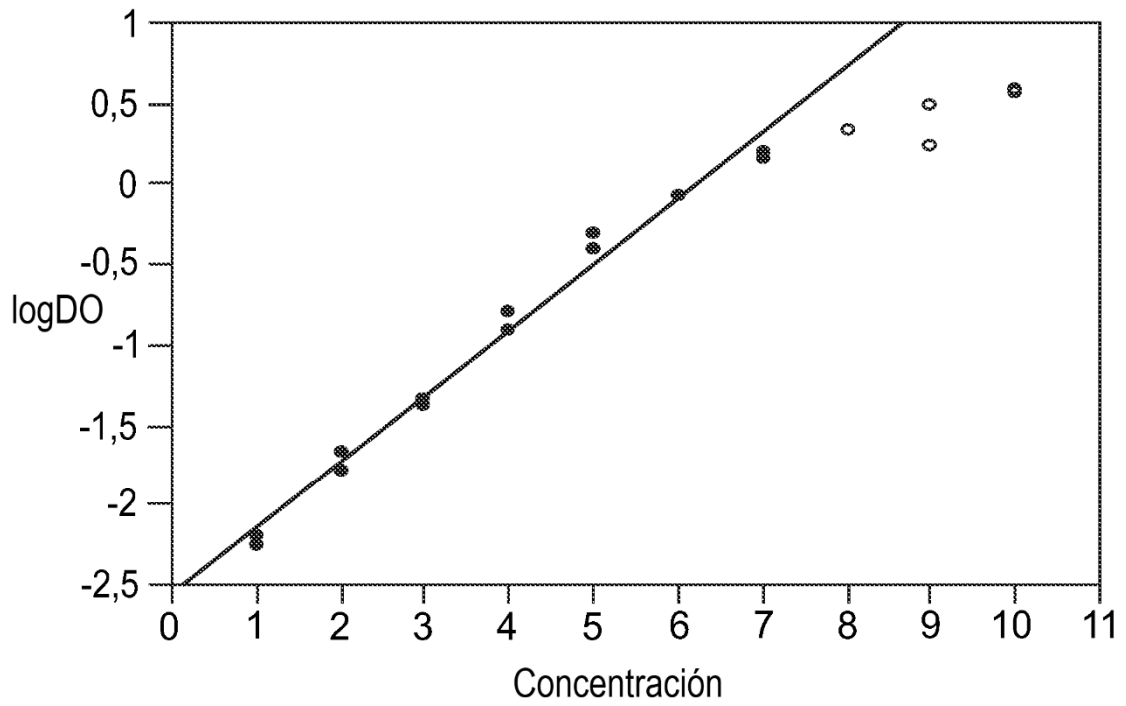


FIG. 4B

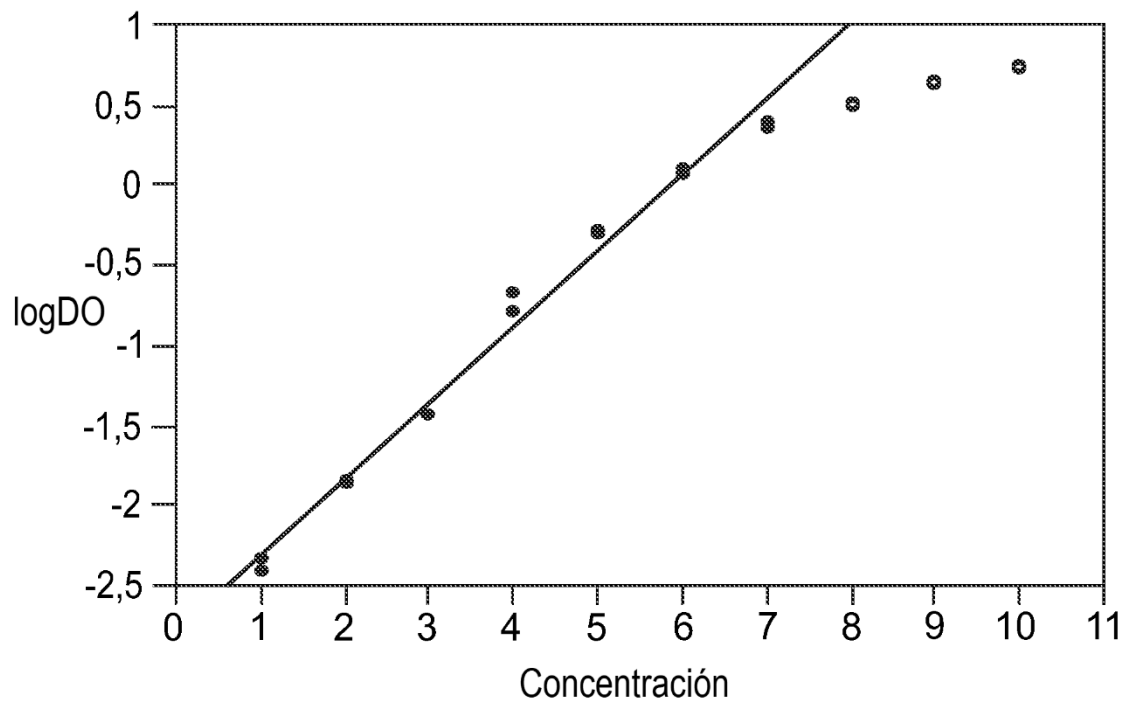


FIG. 4C

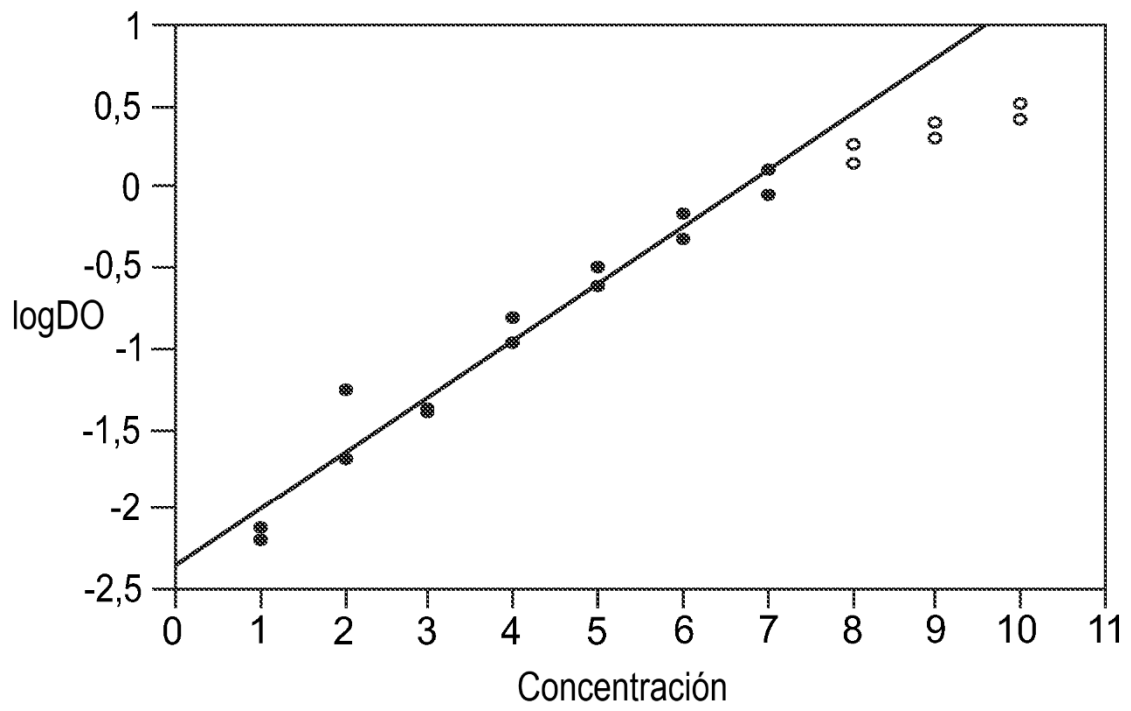


FIG. 4D

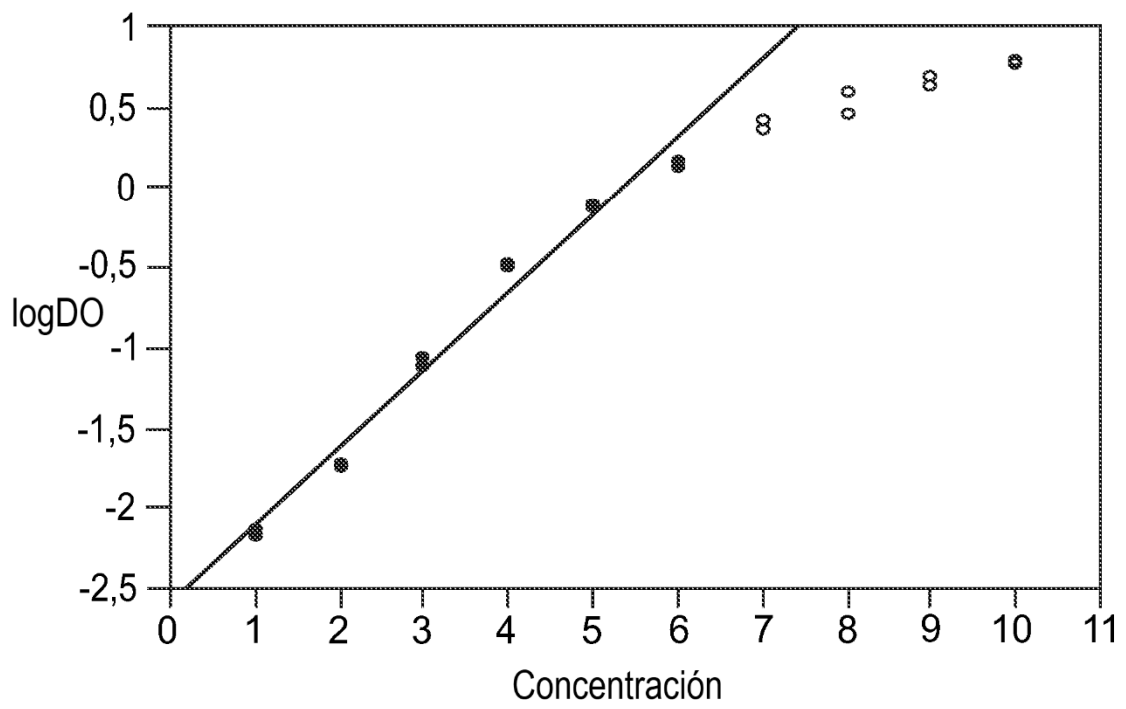


FIG. 4E

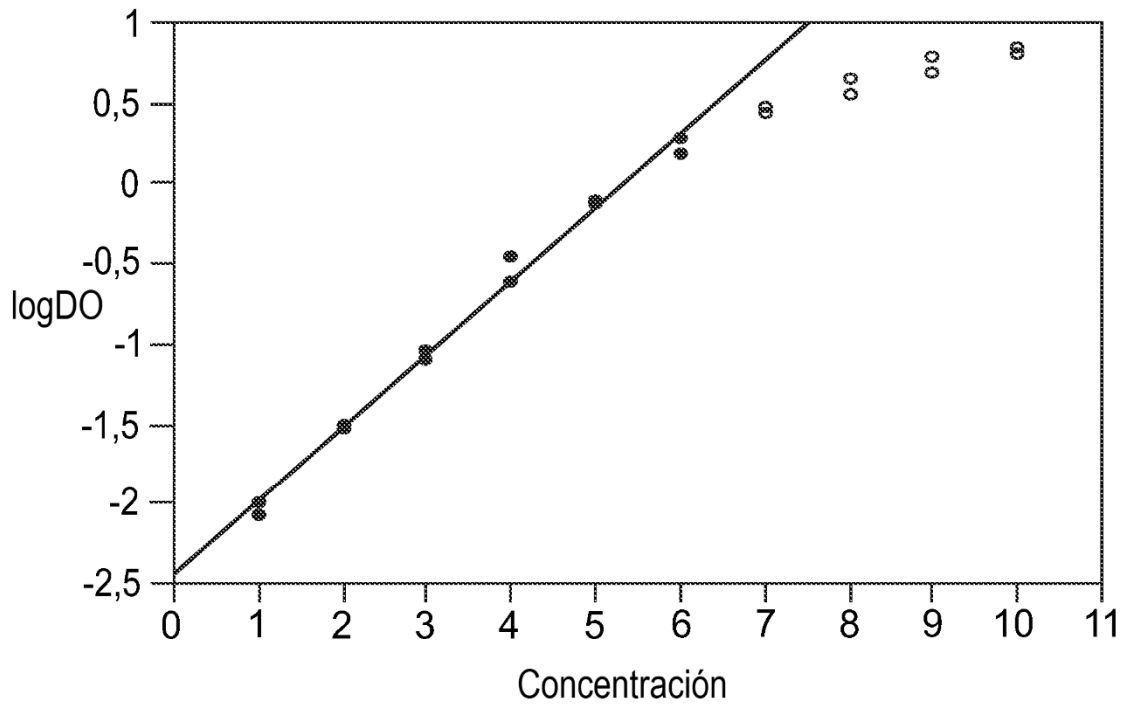


FIG. 4F

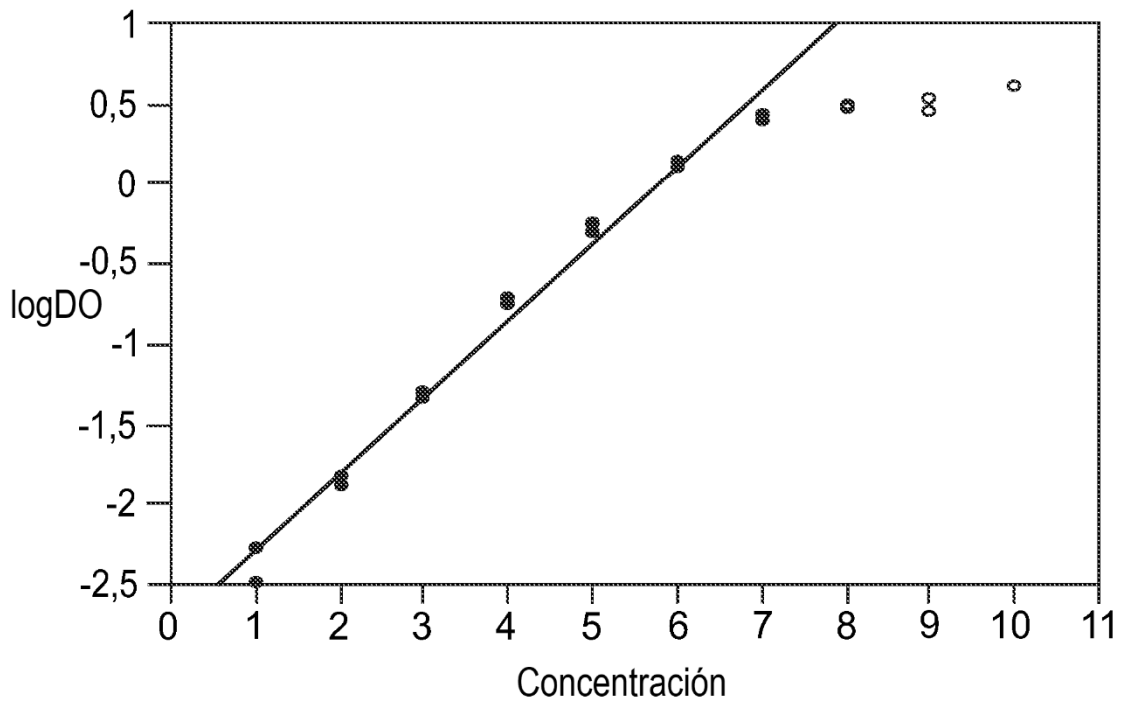


FIG. 5A

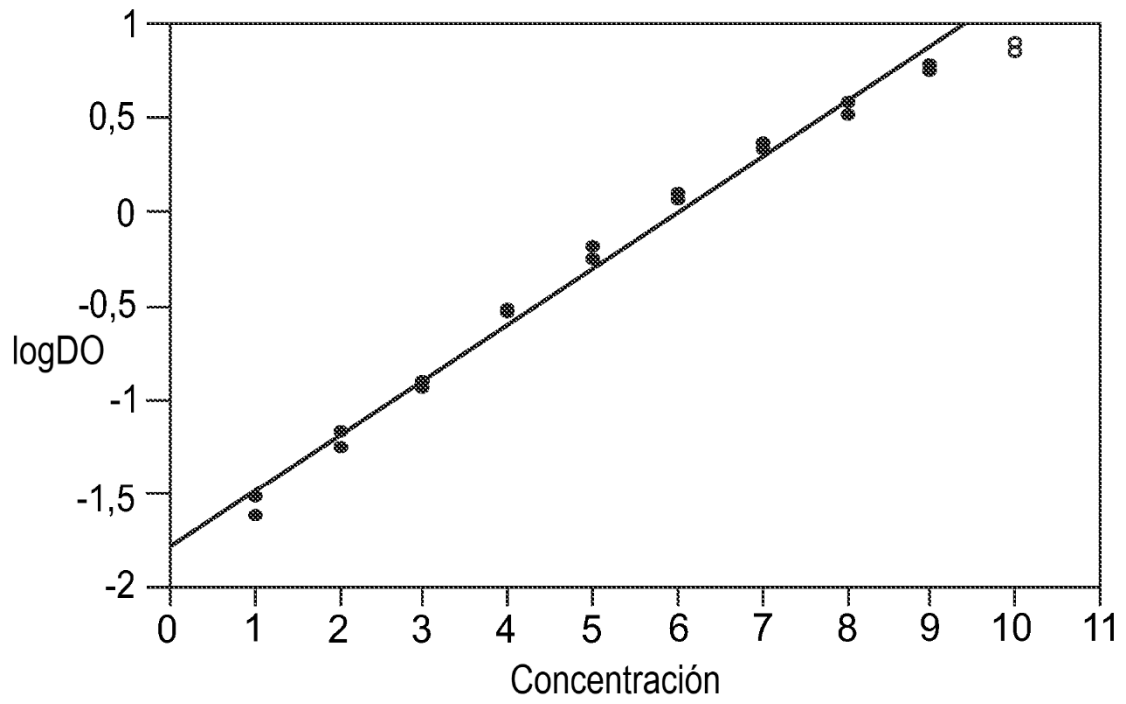


FIG. 5B

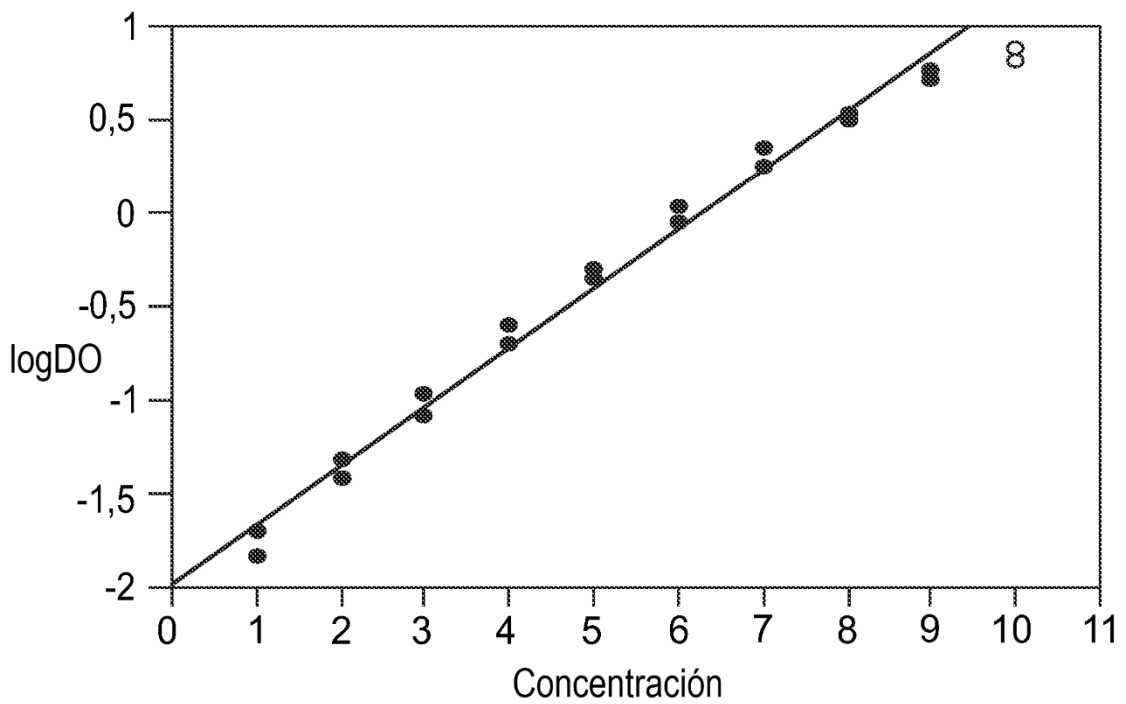


FIG. 5C

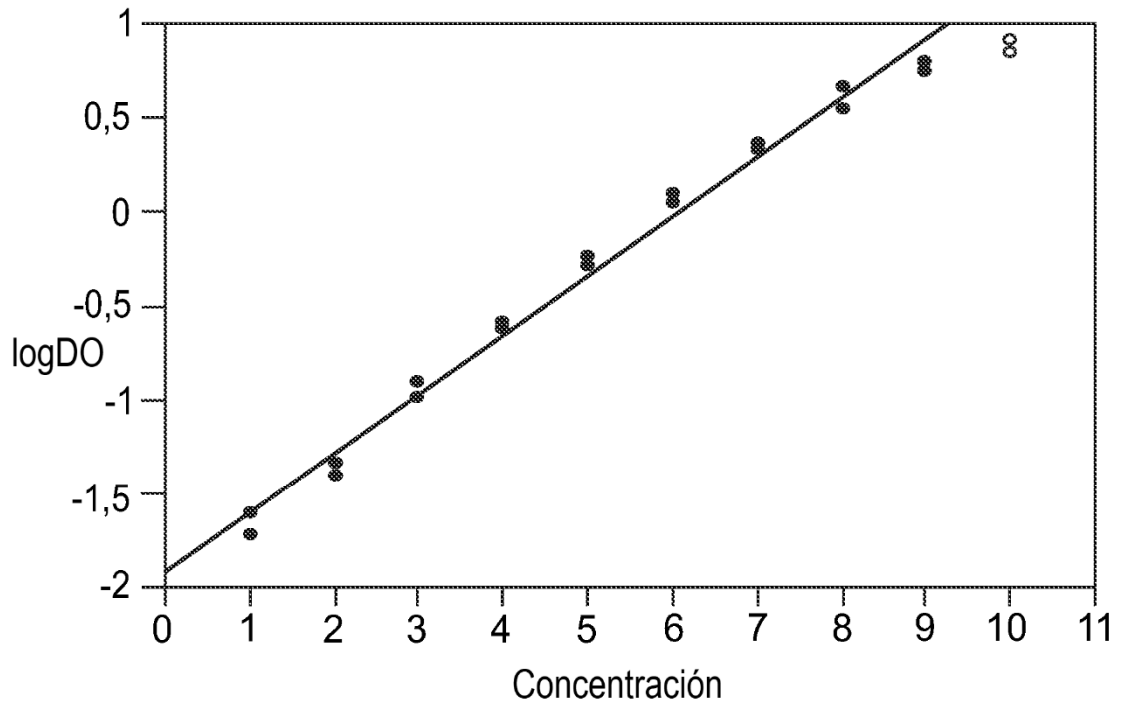


FIG. 5D

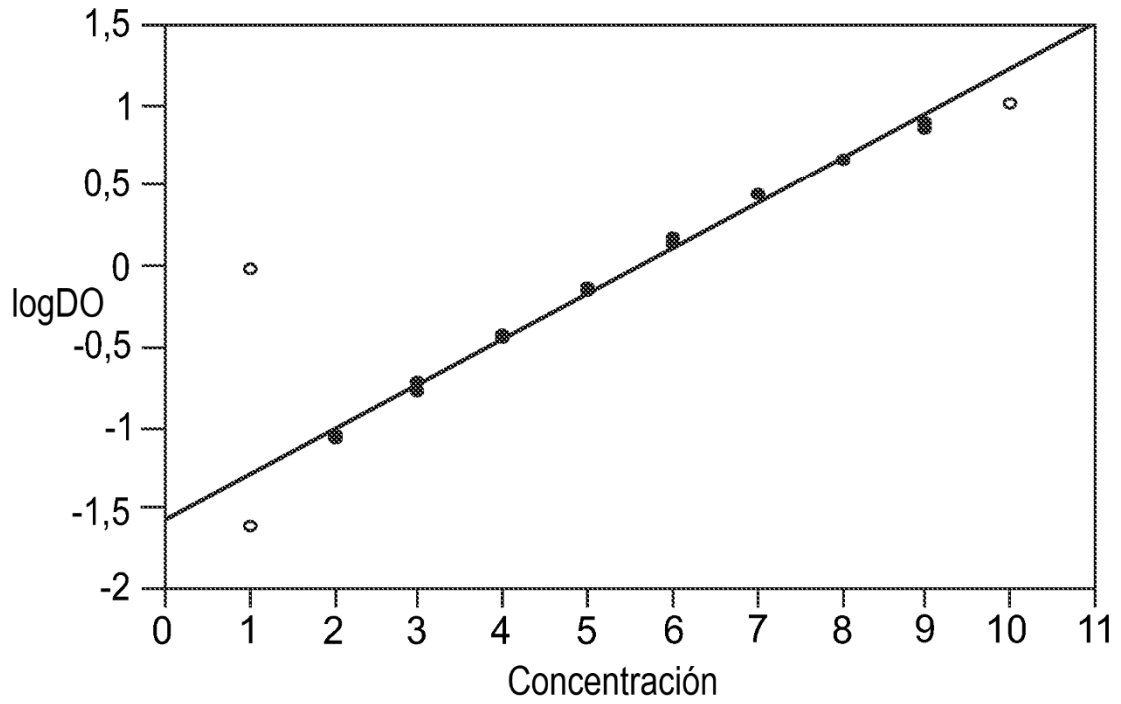


FIG. 5E

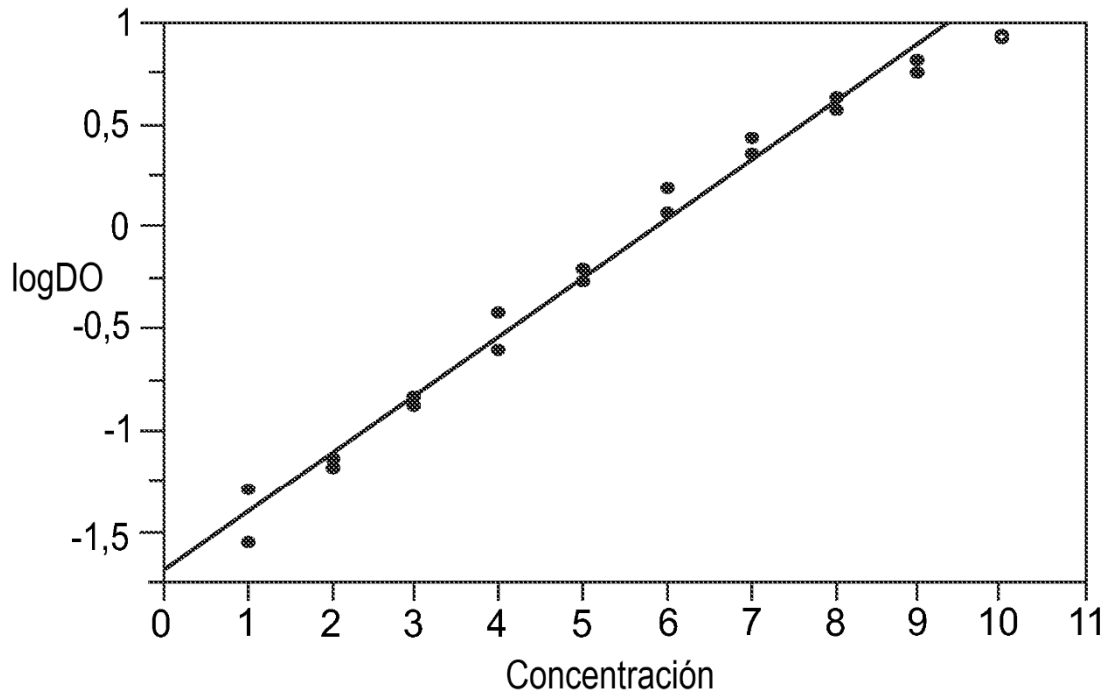


FIG. 5F

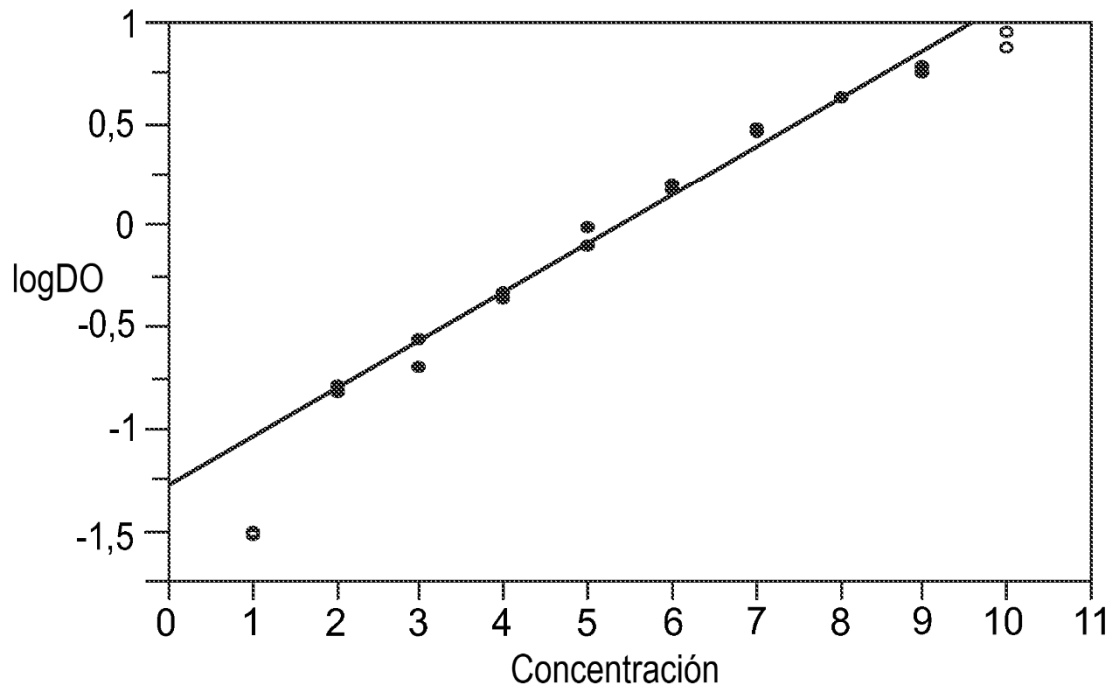


FIG. 6A

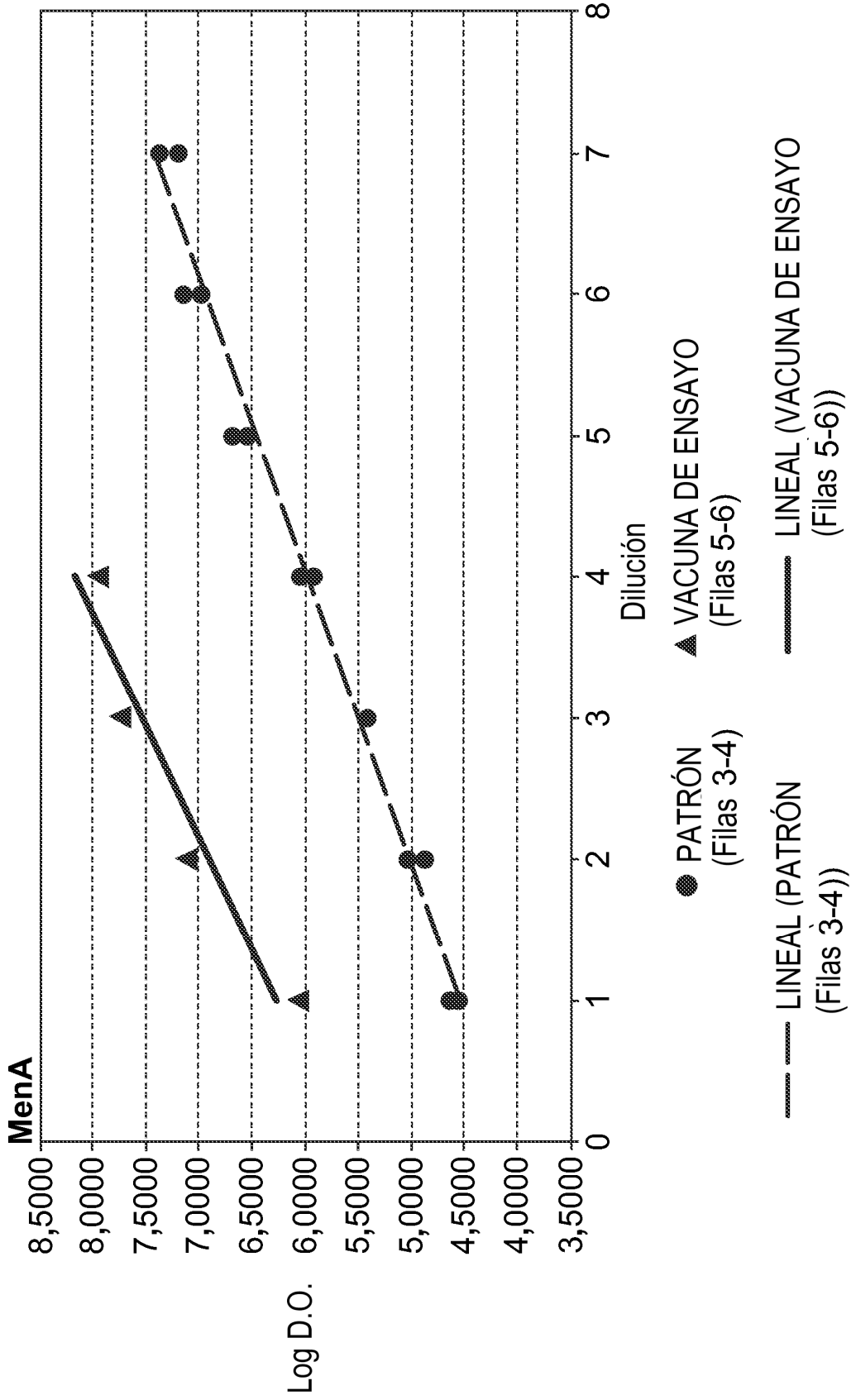


FIG. 6B

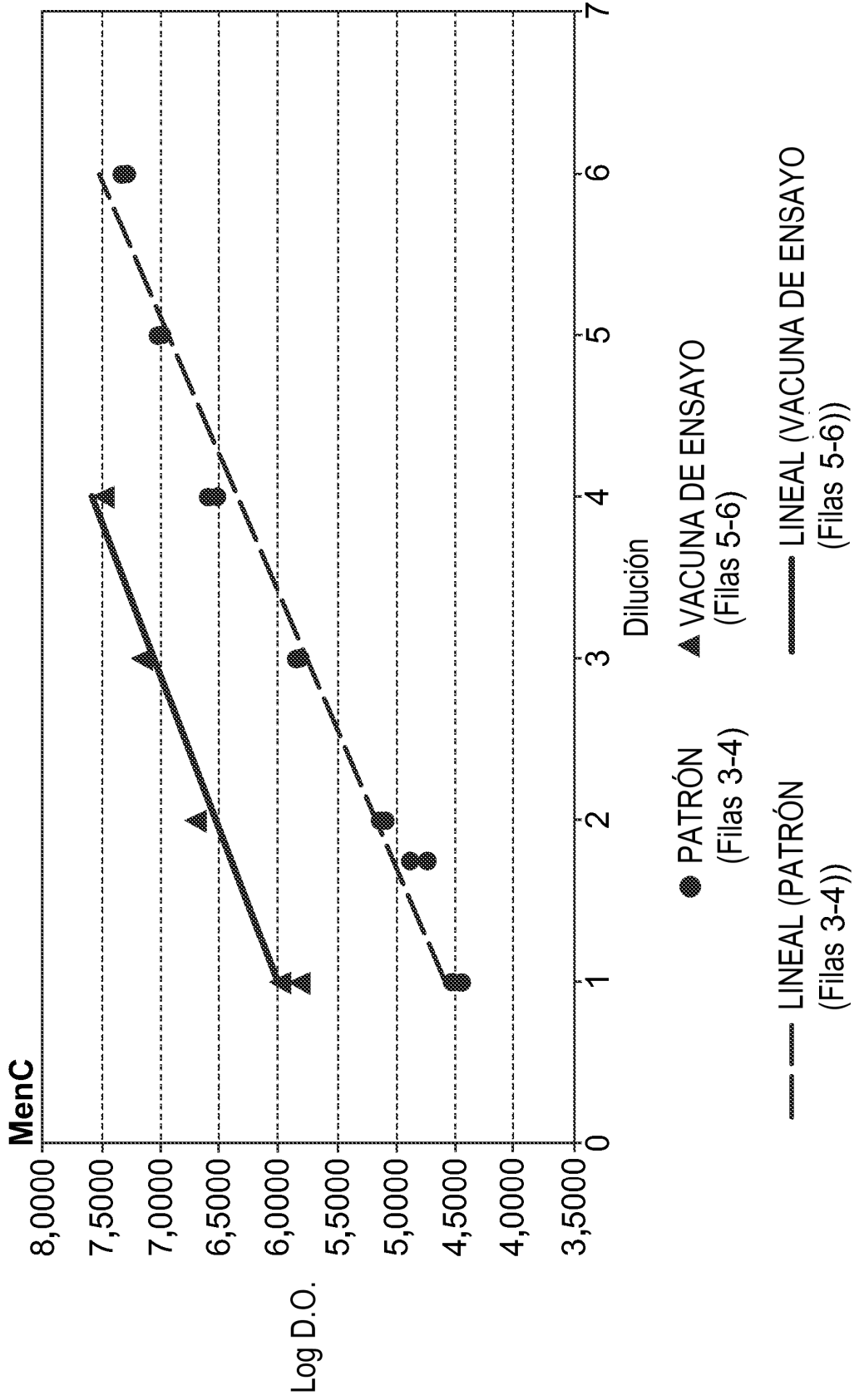


FIG. 6C

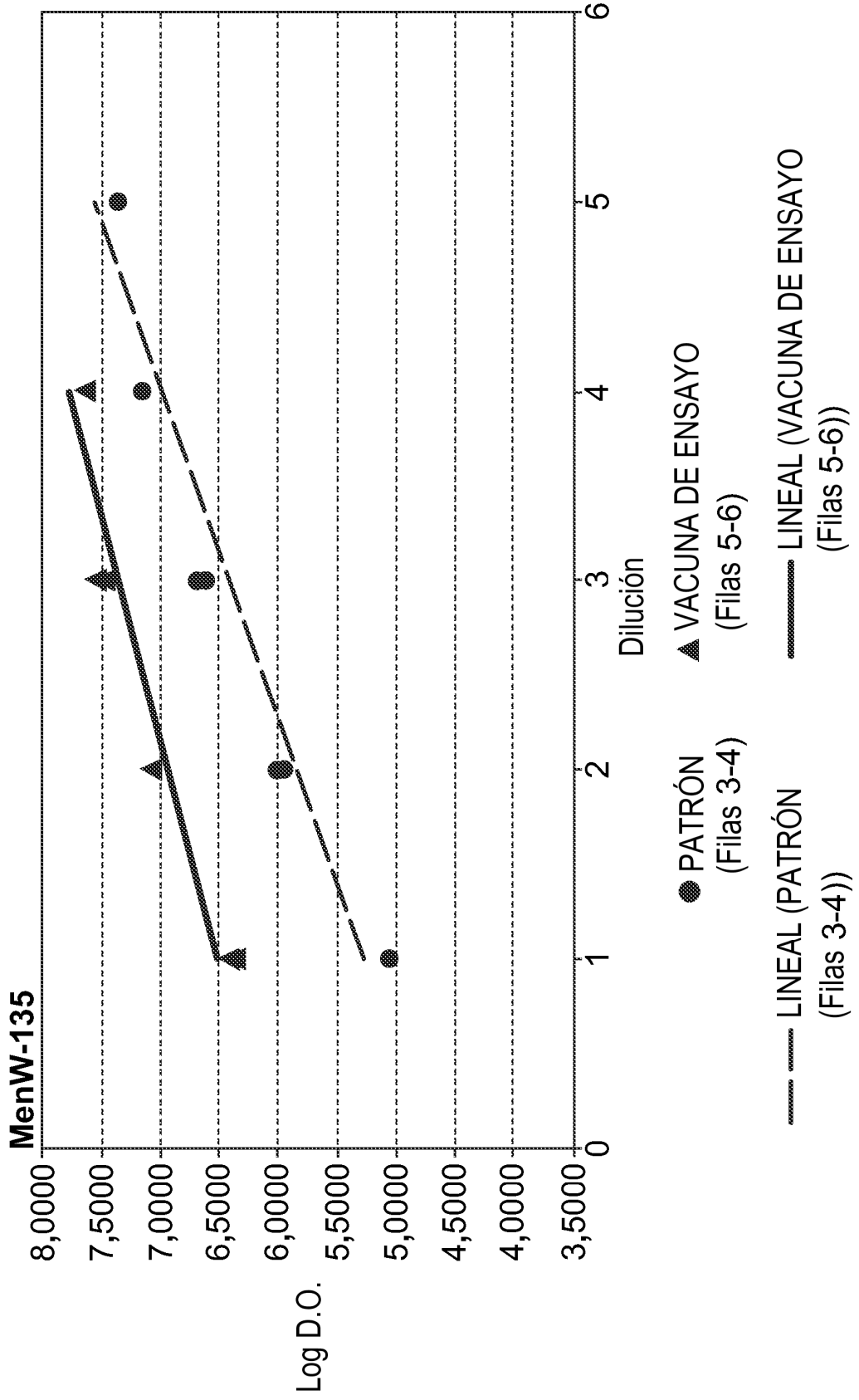


FIG. 6D

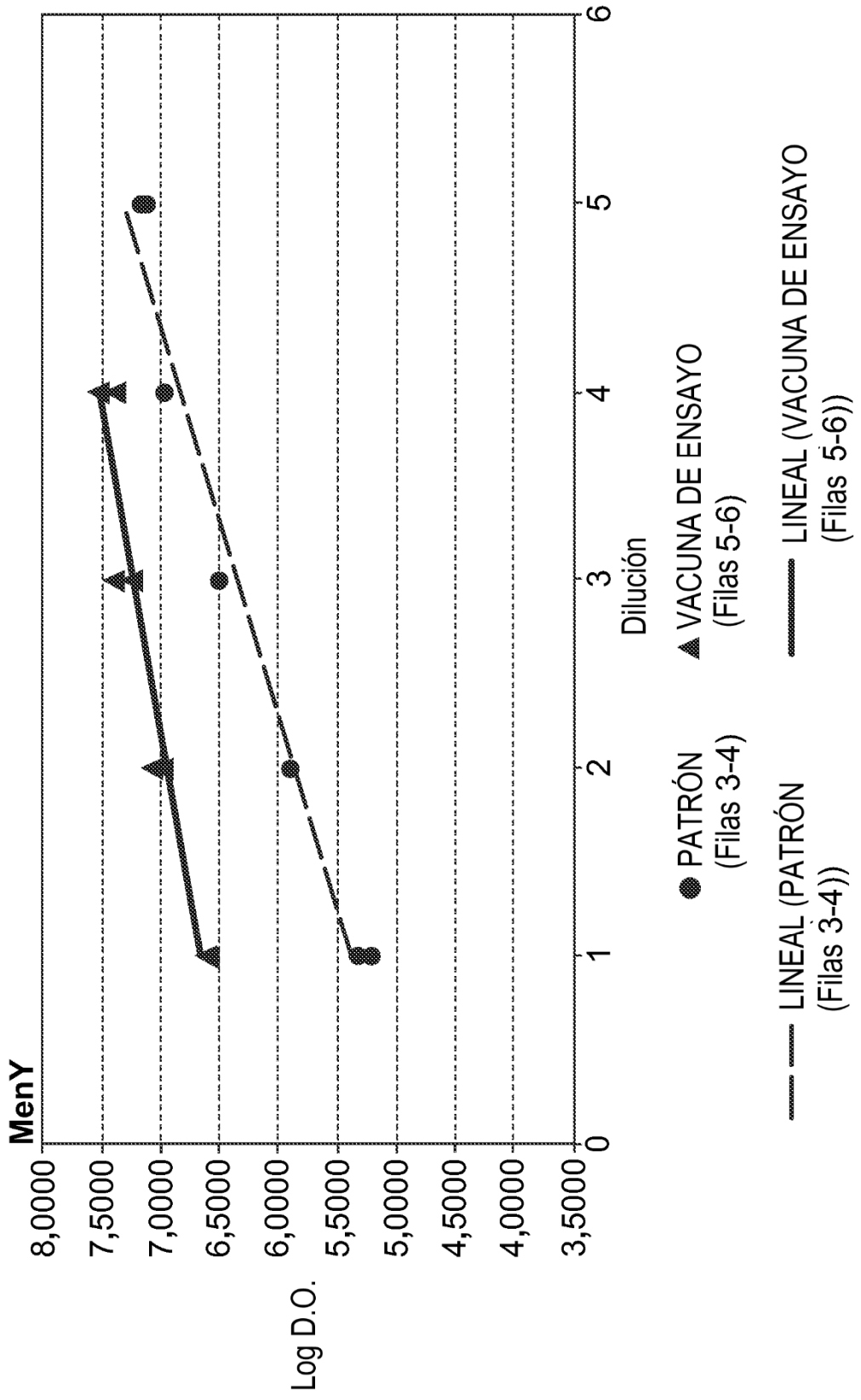


FIG. 7A

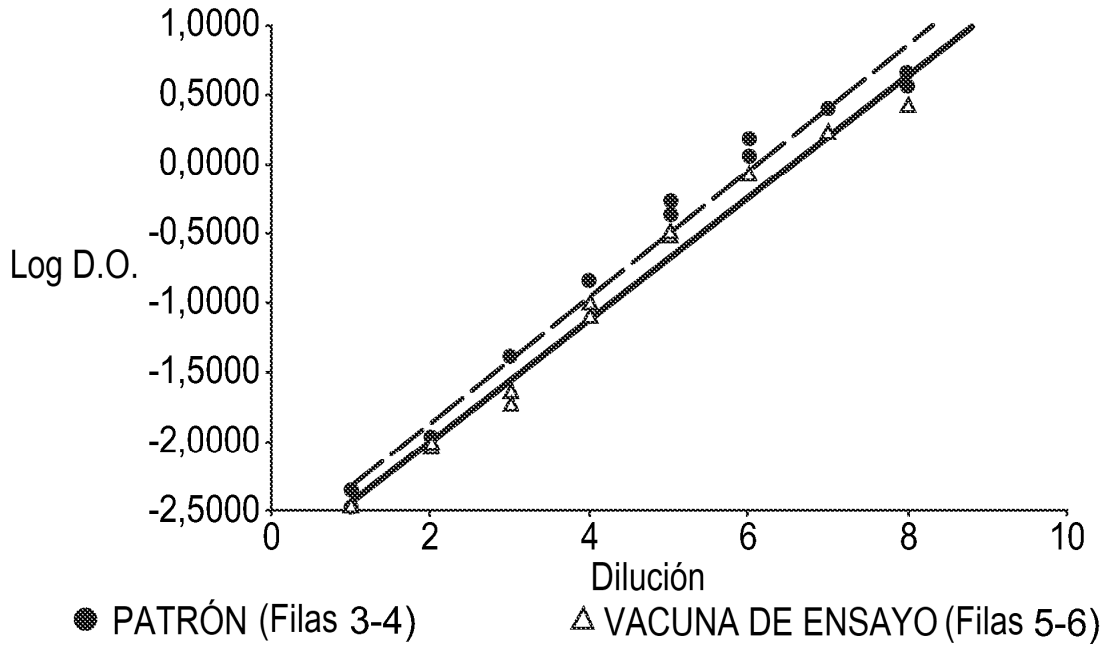
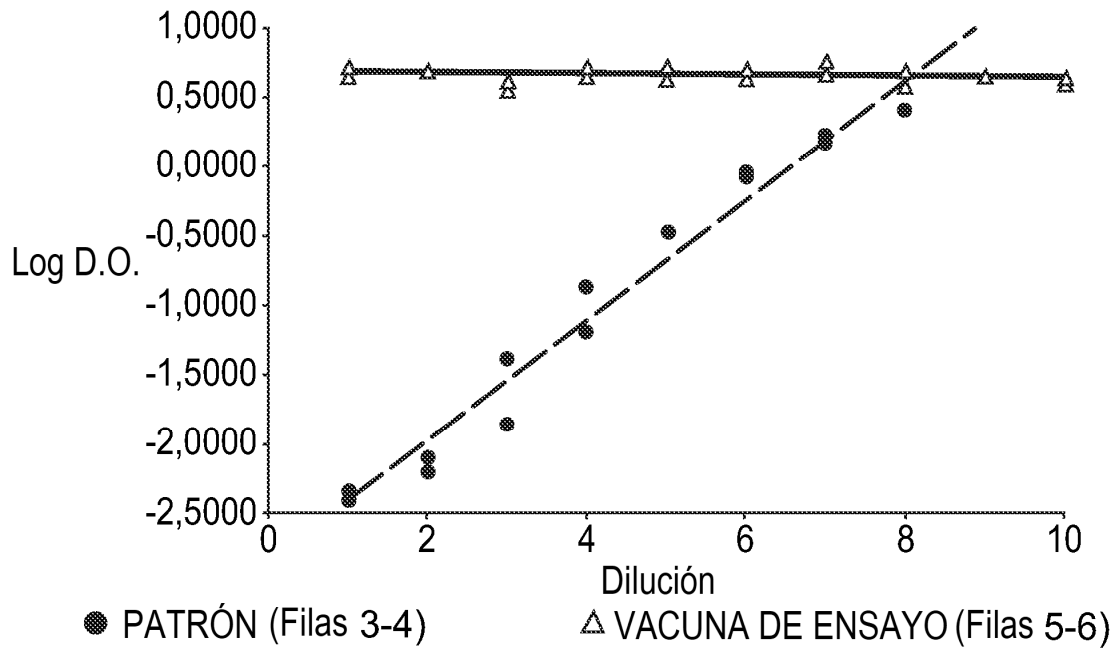


FIG. 7B



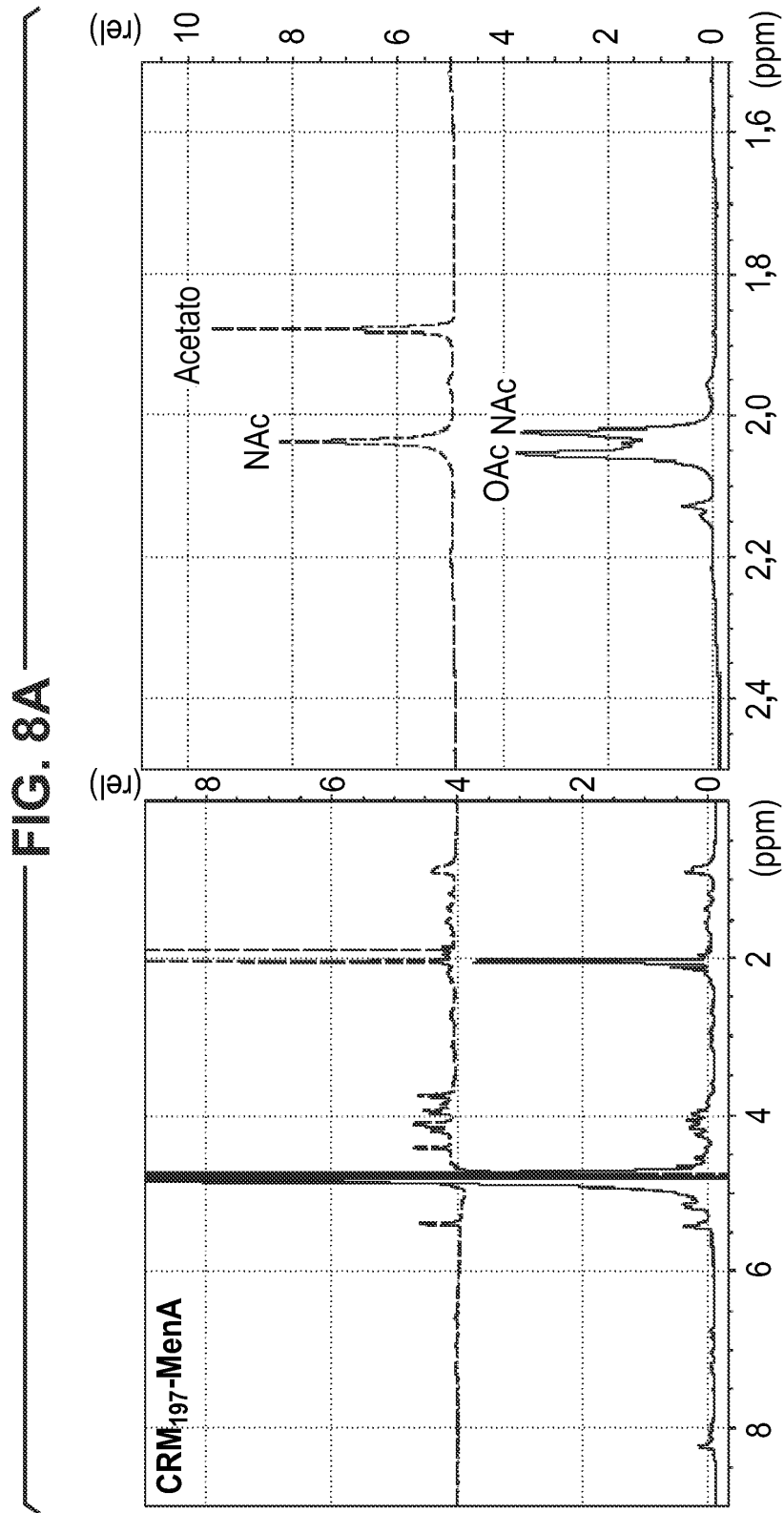


FIG. 8B

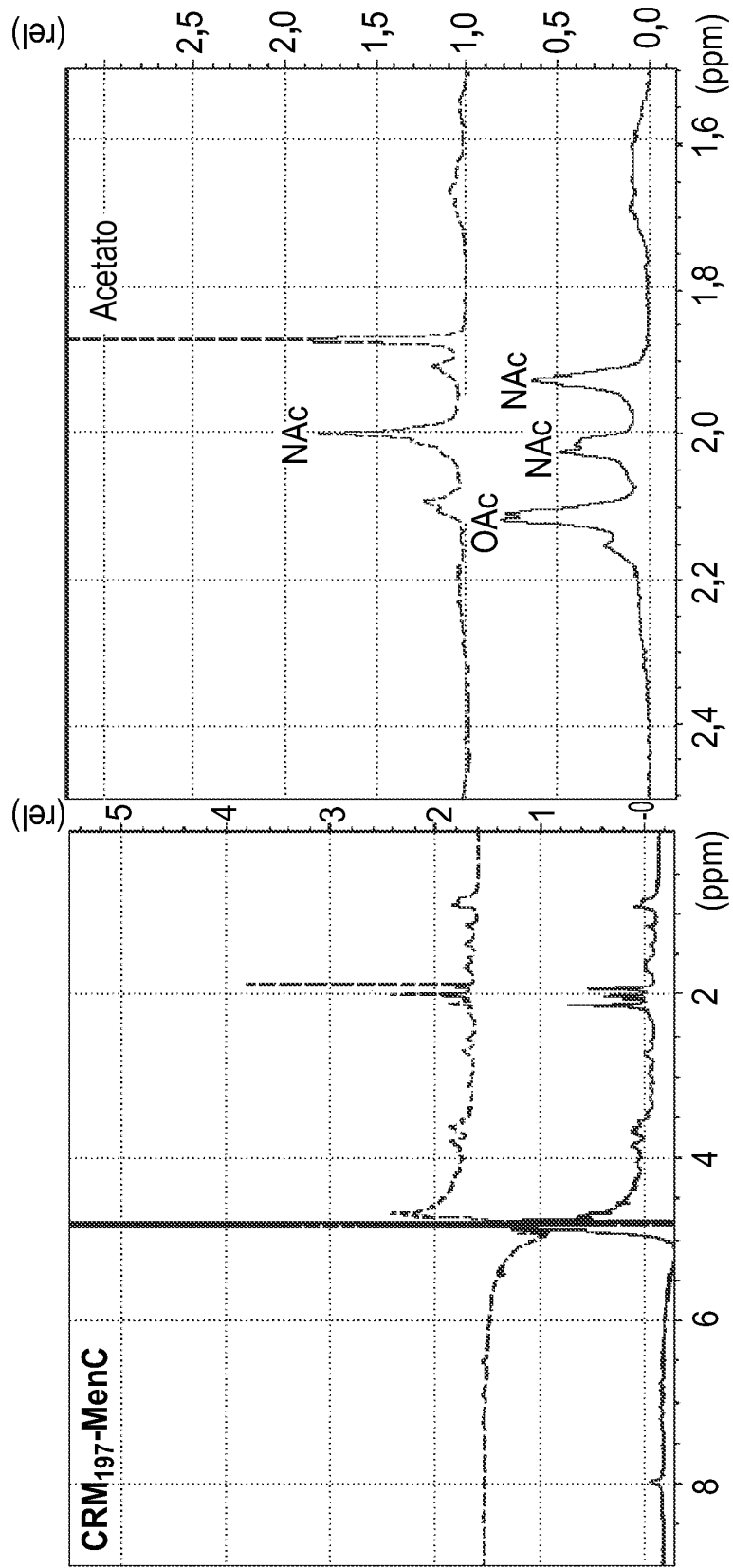


FIG. 8C

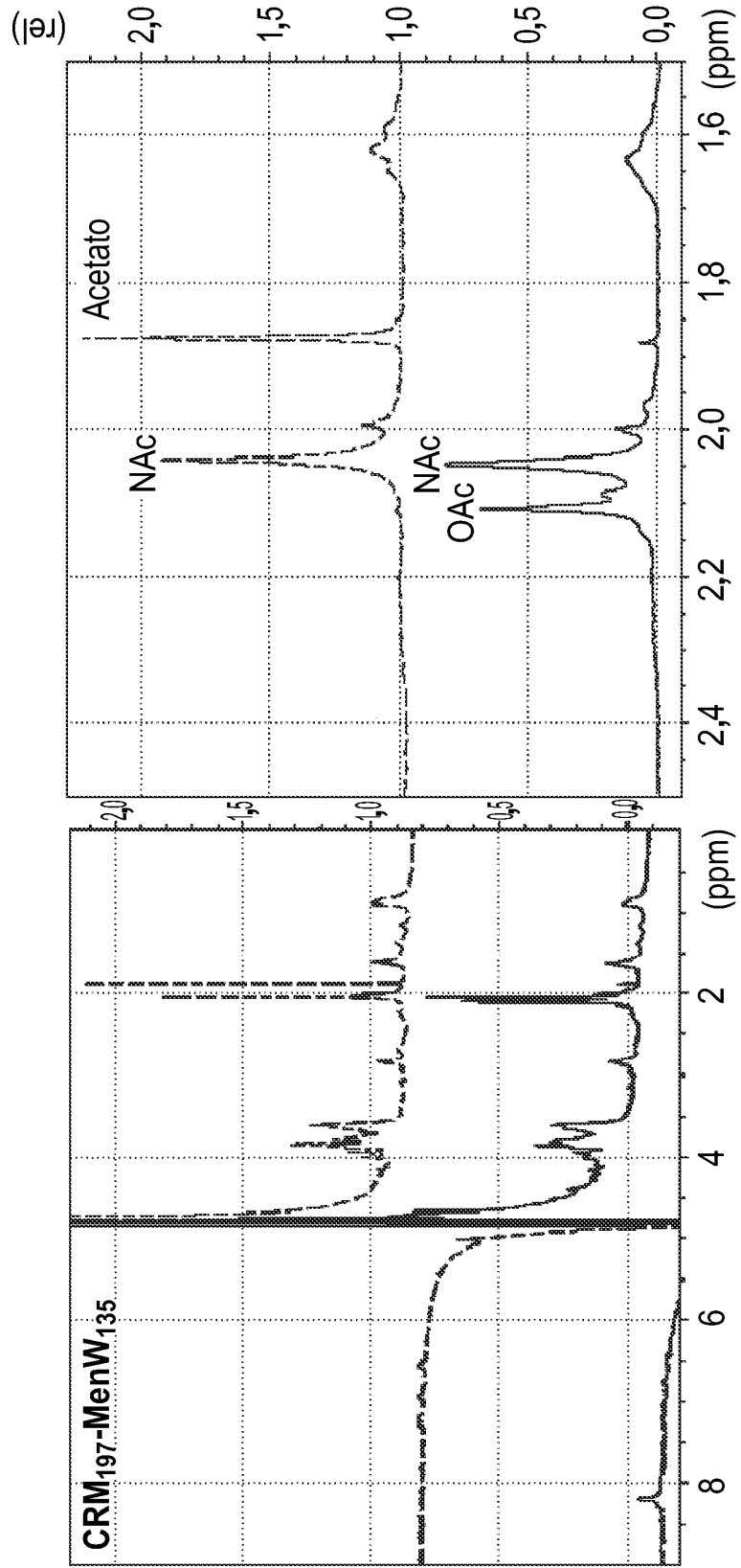


FIG. 8D

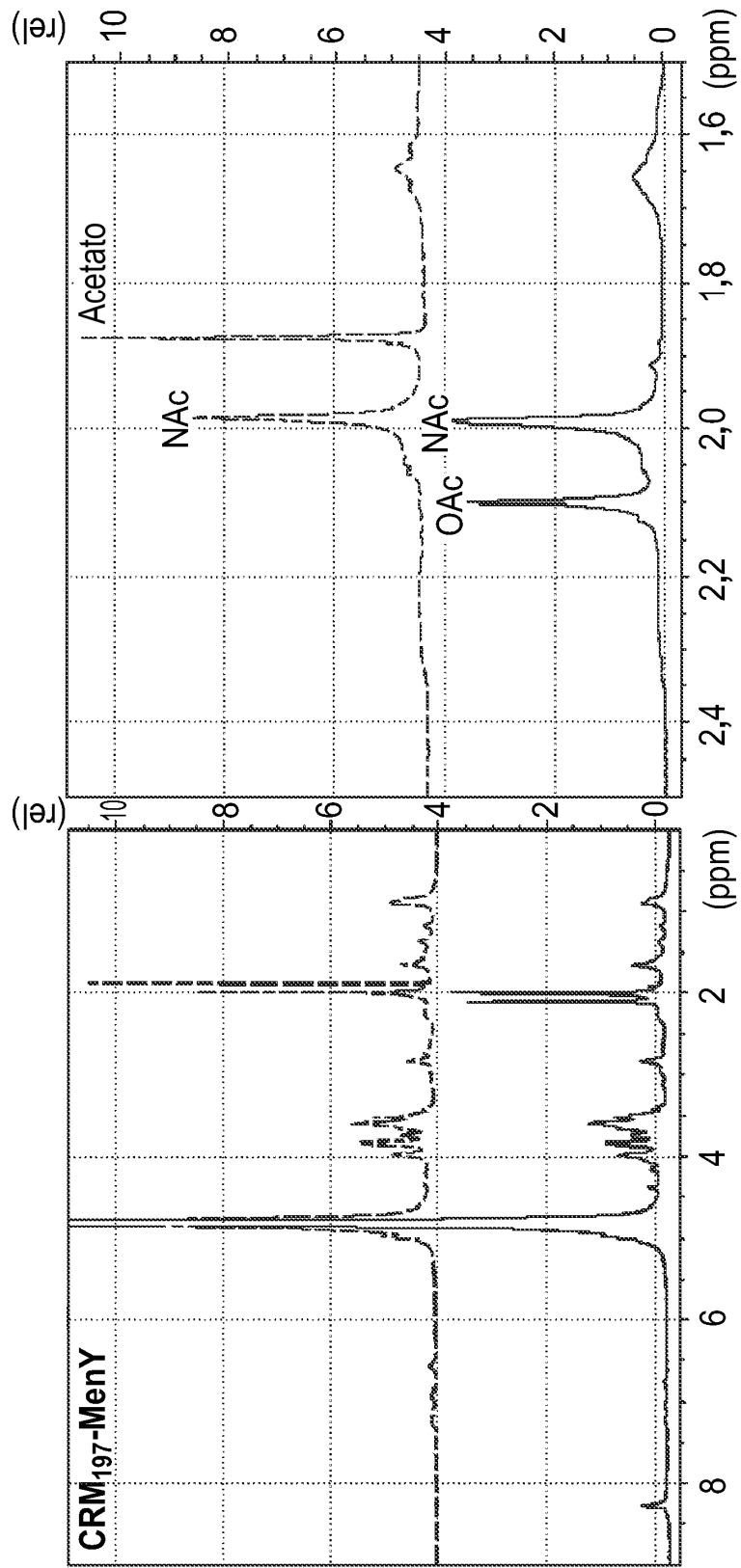


FIG. 9

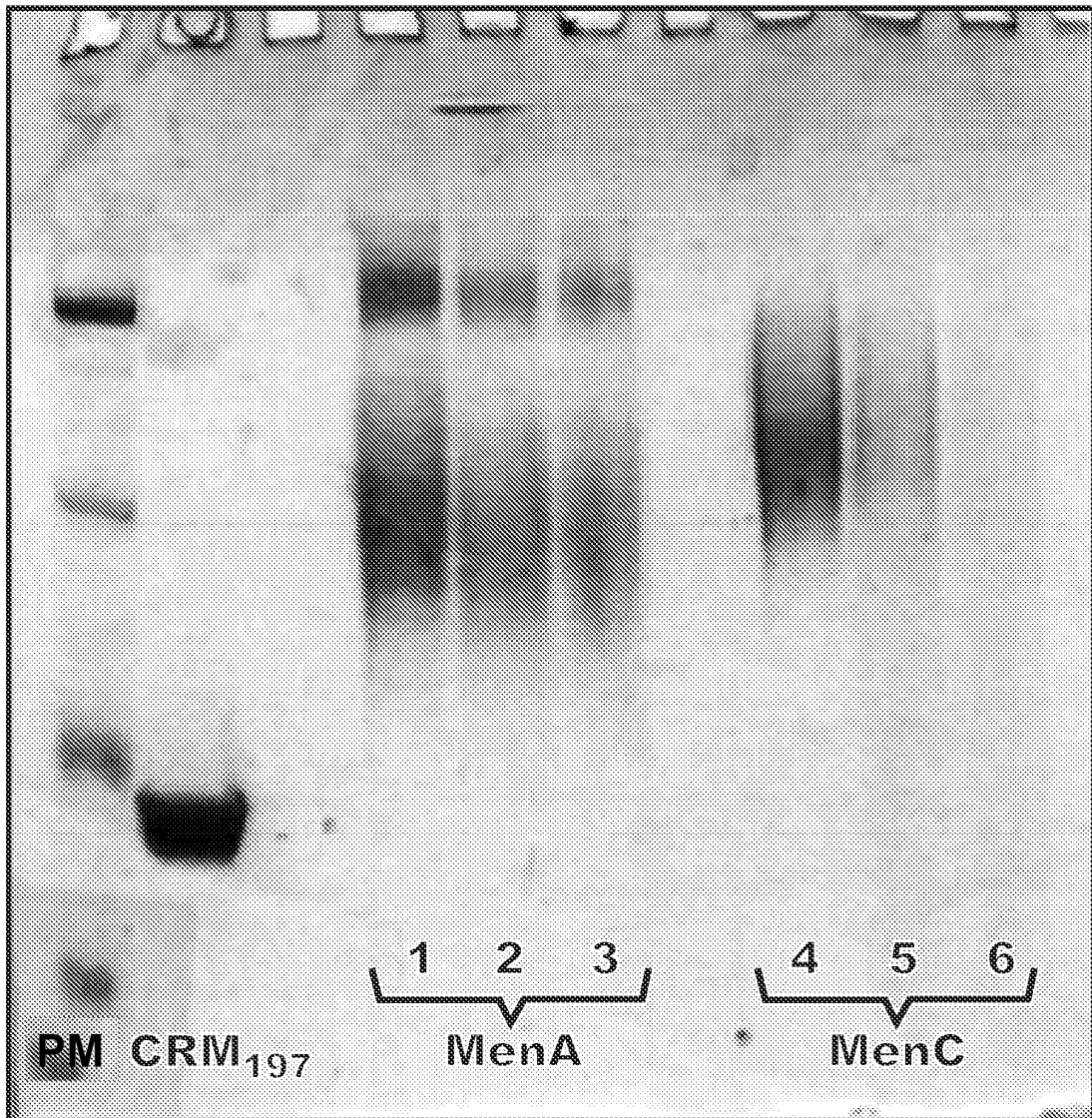
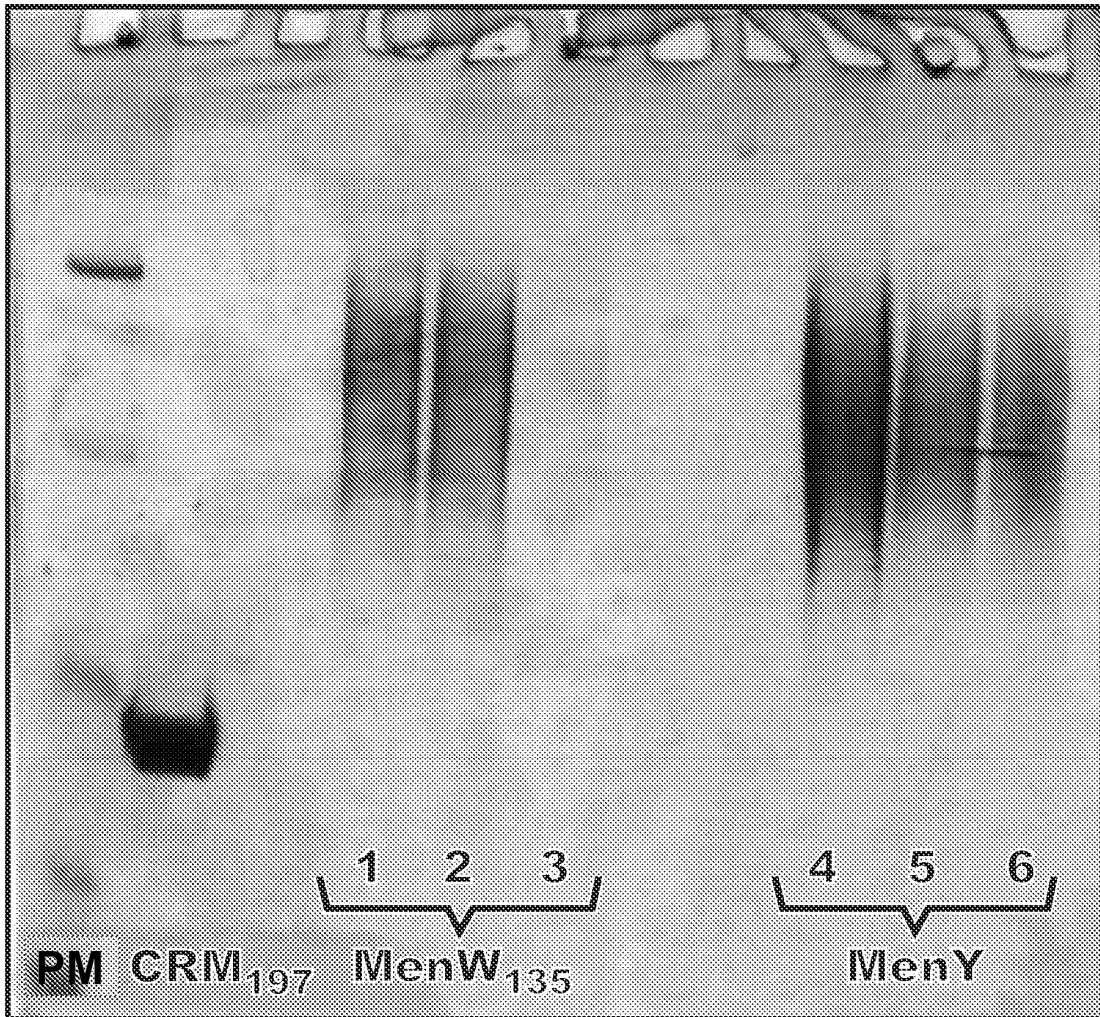


FIG. 10



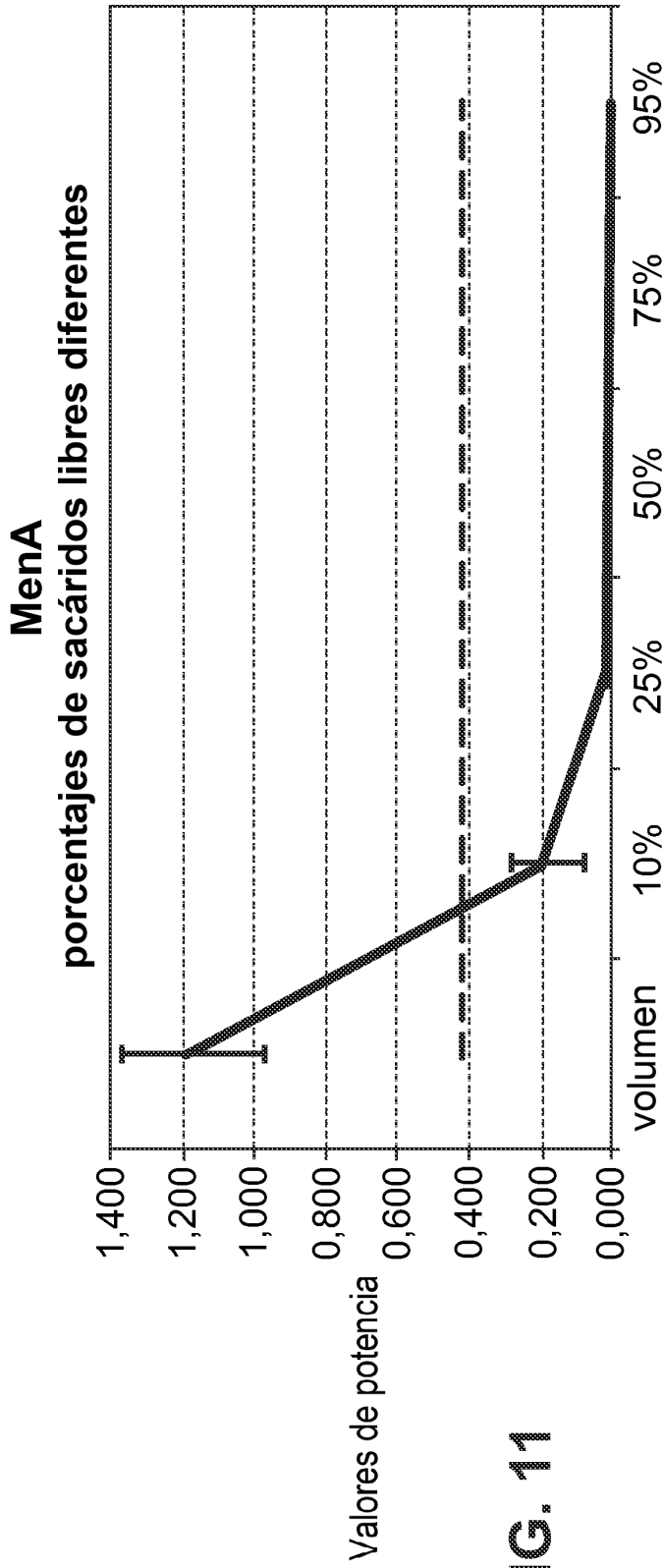


FIG. 11

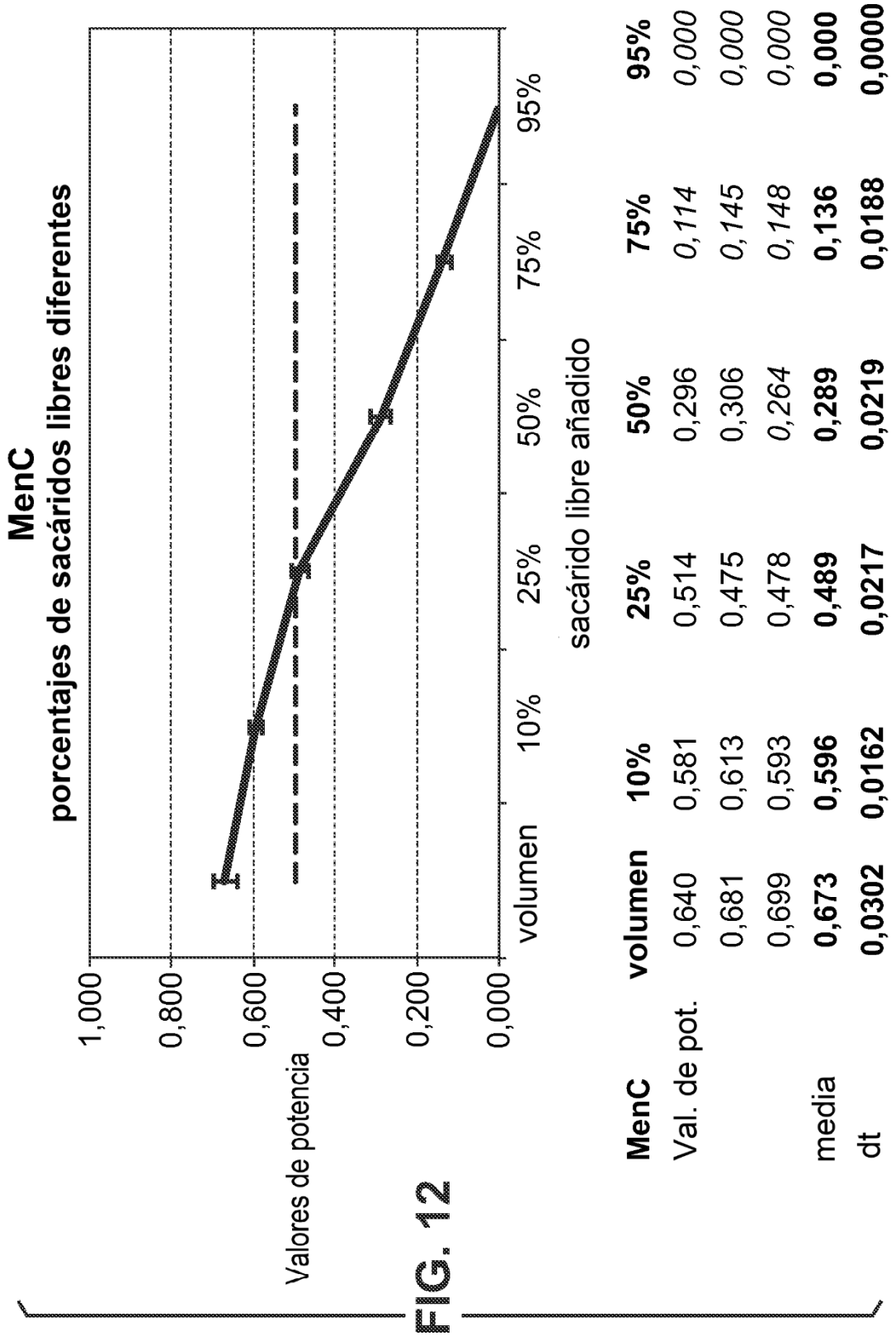
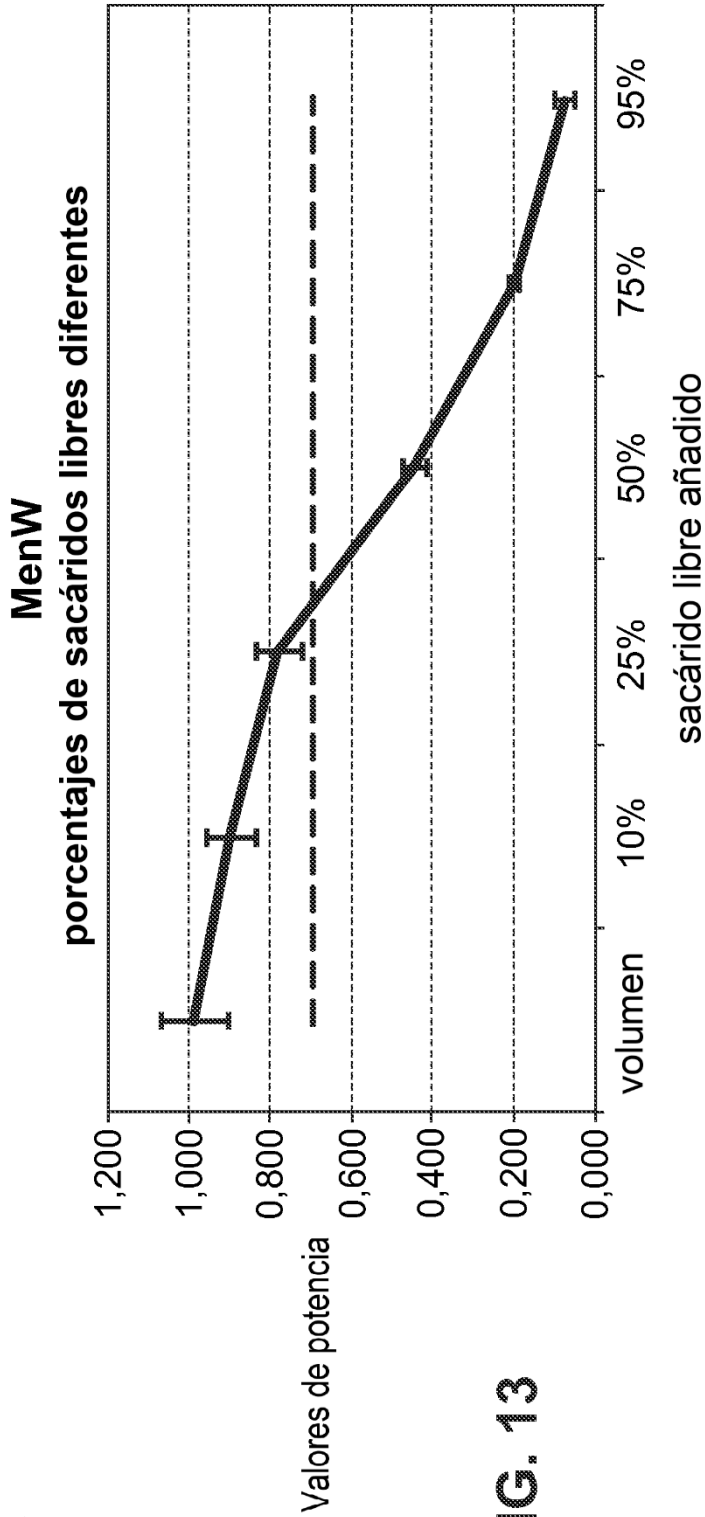


FIG. 12



MenW	volumen	10%	25%	50%	75%	95%
Val. de pot.	0,923	0,840	0,722	0,475	0,216	0,106
	0,958	0,958	0,831	0,419	0,195	0,061
	1,086	0,900	0,788	0,453	0,199	0,068
media	0,989	0,899	0,780	0,449	0,203	0,078
dt	0,0858	0,0590	0,0549	0,0282	0,0112	0,0242

FIG. 13

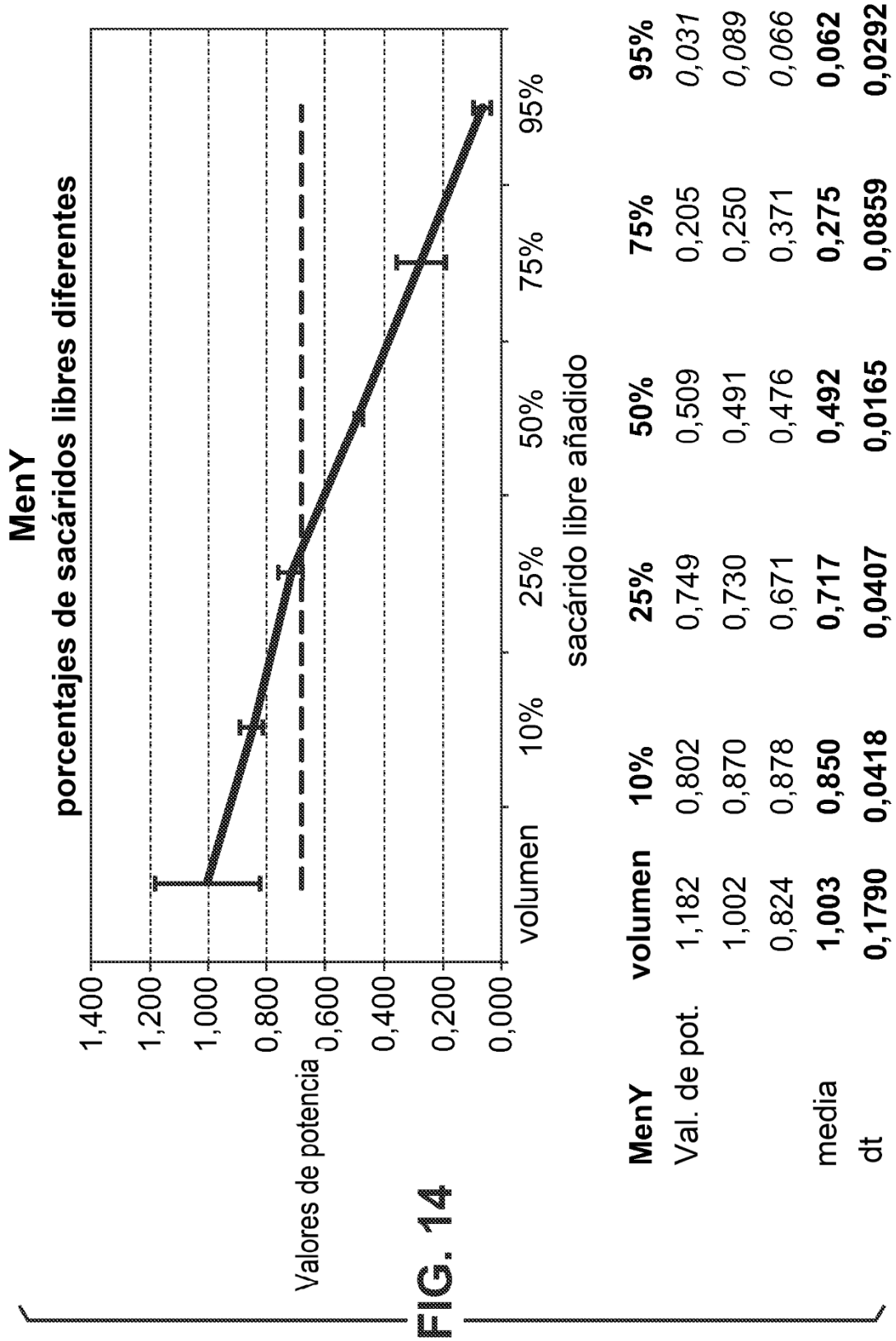


FIG. 14

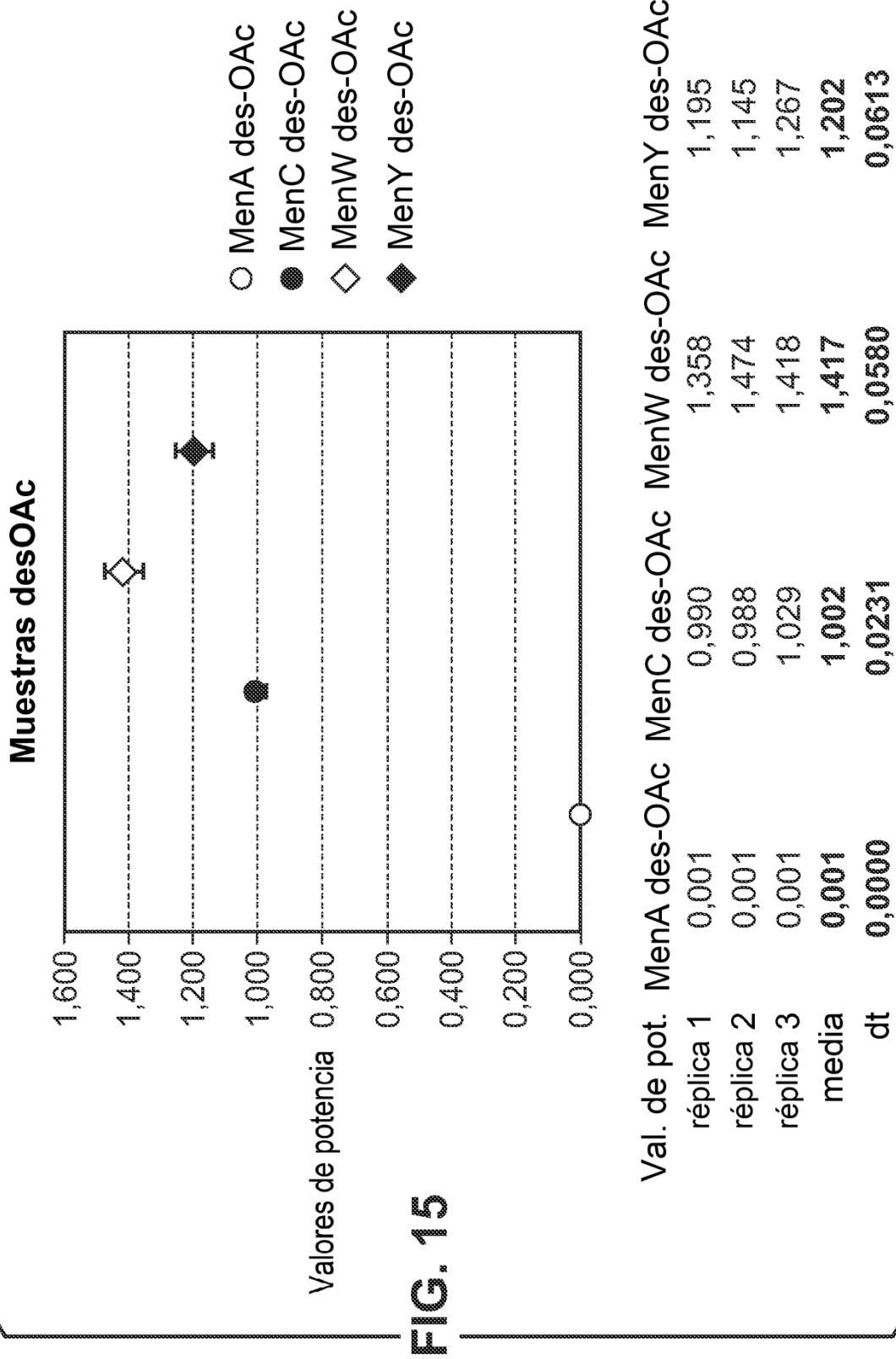


FIG. 15