

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 025**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/095** (2006.01)

**A61K 39/102** (2006.01)

**A61K 39/116** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2006** **E 14198052 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019** **EP 2878307**

54 Título: **Composición inmunógena**

30 Prioridad:

**27.06.2005 GB 0513069**

**27.06.2005 GB 0513071**

**28.07.2005 GB 0515556**

**28.11.2005 GB 0524204**

**21.12.2005 GB 0526041**

**21.12.2005 GB 0526040**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.03.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BIEMANS, RALPH LEON;**  
**BOUTRIAU, DOMINIQUE;**  
**CAPIAU, CARINE;**  
**DENOEL, PHILIPPE;**  
**DUVIVIER, PIERRE y**  
**POOLMAN, JAN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 747 025 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Composición inmunógena

5 La presente invención se refiere a composiciones inmunógenas que comprenden sacáridos capsulares bacterianos de *N. meningitidis* conjugados con una proteína de vehículo. Se refiere adicionalmente a vacunas y kits de vacuna que comprenden dichos conjugados de sacárido, procesos para generar las composiciones inmunógenas y vacunas y las vacunas y composiciones inmunógenas de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedad causada por infección por *N. meningitidis*. También se divulgan métodos de inmunización contra infección usando los  
10 conjugados de sacárido y el uso de los conjugados de sacárido en la fabricación de un medicamento.

*Neisseria meningitidis* es un patógeno humano gramnegativo que causa meningitis bacteriana. Basándose en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado doce serogrupos de *N. meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y y Z). El serogrupo A (MenA) es la causa más común de enfermedad epidémica en África subsahariana.  
15 Los serogrupos B y C son responsables de la mayoría de casos en países en desarrollo, estando causado el resto de los casos por W135 e Y.

Se conocen en la técnica composiciones inmunógenas que comprenden sacáridos de *N. meningitidis* conjugados con proteínas de vehículo; teniendo la proteína de vehículo el efecto conocido de hacer que el antígeno polisacárido independiente de T sea un antígeno dependiente de T que puede activar una respuesta de memoria inmunitaria. Por ejemplo, el documento WO 02/58737 divulga una vacuna que comprende polisacáridos capsulares purificados de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis* conjugados con una proteína de vehículo. Sin embargo, esta solicitud muestra que todos los polisacáridos deben conjugarse esencialmente de la misma manera (a través del mismo conector al mismo vehículo proteínico).  
20

25 El documento WO2004/103400 se refiere a conjugados de polisacárido-proteína derivados de meningococos multivalentes y vacuna.

30 También se refiere a esto Rennels et al., (2002) The Pediatric Infectious Disease Journal, 21(10): 978-9 que se refiere al estudio de aumento de la dosis, seguridad e inmunogenicidad de una vacuna de conjugado diftérico de polisacárido de meningococos tetravalente en lactantes mayores.

35 Sigue habiendo una necesidad de desarrollar vacunas de conjugado mejoradas contra meningitis por *Neisseria*. La presente invención se refiere a proporcionar una vacuna de conjugado de polisacárido de meningococos donde la conjugación de cada polisacárido está dirigida (en lugar de ser uniforme) para conseguir una vacuna de combinación eficaz. En particular, es ventajoso combinar determinados sacáridos de meningococos conjugados con sus vehículos proteínicos a una elevada relación de sacárido:proteína con otros a una baja relación.

40 Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención se proporciona una composición inmunógena que comprende sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis* (MenA), sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC), sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis* (MenY) y sacárido capsular del serogrupo W de *N. meningitidis* (MenW) conjugados por separado con el mismo tipo de proteína de vehículo, en la que:

45 (a) MenA o MenA y MenC se conjugan con la proteína de vehículo mediante un grupo carboxilo en el vehículo proteínico y un conector ADH, en la que el sacárido capsular o cada sacárido capsular conjugado mediante el conector ADH se conjuga con el conector con química de CDAP y la proteína de vehículo se conjuga con el conector ADH con química de EDAC, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 1:2-1:5;

50 (b) los sacáridos de *N. meningitidis* de MenC, MenY y MenW distintos de (a), se conjugan con la proteína de vehículo mediante un grupo amino en el vehículo proteínico, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 5:1-1:1,99; y

(c) la proteína de vehículo es TT.

55 En una vacuna de MenW, la relación de sacárido Men W a la proteína de vehículo puede ser entre 5:1-1:1,99, 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,8, 1:1-1:1,7, 1:1,2-1:1,6 o 1: 1,4-1:1,5 (p/p). En una vacuna de MenY, la relación de sacárido Men Y a la proteína de vehículo puede ser entre 5:1-1:1,99, 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,9, 1:1-1:1,8, 1:1,1-1:1,6 o 1:1,3-1:1,4 (p/p). En una vacuna de MenA, la relación de sacárido Men A a la proteína de vehículo puede ser entre 1:2-1:5, 1:2,4-1:4, 1:2,7-1:3,5 o 1:2,9-1:3,1 (p/p). En una vacuna de MenC, la relación de sacárido Men C a la proteína de vehículo puede ser entre 5:1-1:1,99, 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,8, 1,3:1-1:1,6, 1,2:1-1:1,4 o 1,1:1-1:1,2 (p/p) o entre 1:2-1:5, 1:2,5-1:4,5, 1:2,7-1:4,3, 1:3-1:4 o 1:3,3-1:3,5 (p/p).  
60

65 La relación de sacárido a proteína de vehículo (p/p) en un conjugado puede determinarse usando el conjugado esterilizado. La cantidad de proteína se determina usando un ensayo de Lowry (por ejemplo, Lowry et al., (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275 o Peterson et al., Analytical Biochemistry 100, 201-220 (1979)) y la cantidad de sacárido se determina usando ICP-OES (espectroscopia de emisión óptica-plasma acoplada inductivamente) para MenA, ensayo

de DMAP para MenC y ensayo de Resorcinol para MenW y MenY (Monsigny et al., (1988) Anal. Biochem. 175, 525-530).

A menudo los sacáridos conjugados a través de un conector tienen mayor incorporación de proteína de vehículo que cuando se unen directamente a la proteína de vehículo. En una vacuna de MenAC, por ejemplo, el sacárido MenA puede conjugarse con una proteína de vehículo a través de un conector y MenC directamente. En una vacuna de MenCY, MenC puede conjugarse a través de un conector y MenY directamente. En una vacuna de MenACWY, MenA puede conjugarse a través de un conector y MenCWY directamente, o MenAC puede conjugarse a través de un conector y MenWY directamente.

También se divulga una composición inmunógena que comprende al menos 2 sacáridos diferentes conjugados por separado al mismo tipo de proteína de vehículo (por ejemplo, DT, CRM197, proteína D o TT), en la que uno o más sacáridos se conjugan a la proteína de vehículo, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 1:2-1:5, y uno o más sacáridos diferentes se conjugan con la proteína de vehículo, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 5:1-1:1,99.

Por ejemplo, en una vacuna MenAC, MenA puede conjugarse a la proteína de vehículo con una relación de sacárido:proteína (p/p) entre 1:2-1:5 y MenC conjugarse con la proteína de vehículo con una relación de sacárido:proteína (p/p) entre 5:1-1:1,99. En una vacuna de MenCY, MenC puede conjugarse con la proteína de vehículo con una relación de sacárido:proteína (p/p) entre 1:2-1:5 y MenY conjugarse con la proteína de vehículo con una relación de sacárido:proteína (p/p) entre 5:1-1:1,99. En una vacuna MenACWY, MenAC puede conjugarse con la proteína de vehículo con una relación de sacárido:proteína (p/p) entre 1:2-1:5 y MenWY conjugarse con la proteína de vehículo con una relación de sacárido:proteína (p/p) entre 5:1-1:1,99, o MenA puede conjugarse con la proteína de vehículo con una relación de sacárido:proteína (p/p) entre 1:2-1:5 y MenCWY conjugarse con la proteína de vehículo con una relación de sacárido:proteína (p/p) entre 5:1-1:1,99.

La presente invención también proporciona:

- una vacuna que comprende la composición inmunógena de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- un proceso para generar la vacuna de la invención que comprende la etapa de mezclar la composición inmunógena de la invención con un excipiente farmacéuticamente aceptable; y
- una composición inmunógena de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedad causada por infección por *Neisseria meningitidis*.

También se divulga un método de inmunización de un hospedador humano contra enfermedad causada por *Neisseria meningitidis*, que comprende administrar al hospedador una dosis inmunoprotectora de la composición inmunógena o vacuna de la invención.

## Descripción de figuras

### Figura 1

- A - Diagrama de barras que muestra las respuestas de GMC en un ELISA anti-MenY. ENYTT012 es un conjugado de MenY-TT preparado a partir de polisacárido MenY nativo. ENYTT014 es un conjugado de MenY-TT preparado a partir de polisacárido MenY microfluidizado que ha experimentado 40 ciclos de microfluidización. ENYTT015bis es un conjugado de MenY-TT preparado a partir de polisacárido MenY microfluidizado que ha experimentado 20 ciclos de microfluidización.

- B - Diagrama de barras que muestra las respuestas de GMT en un ensayo de SBA anti-MenY. ENYTT012 es un conjugado de MenY-TT preparado a partir de polisacárido MenY nativo. ENYTT014 es un conjugado de MenY-TT preparado a partir de polisacárido MenY microfluidizado que ha experimentado 40 ciclos de microfluidización. ENYTT015bis es un conjugado de MenY-TT preparado a partir de polisacárido MenY microfluidizado que ha experimentado 20 ciclos de microfluidización.

### Descripción detallada

La presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis* (MenA), sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC), sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis* (MenY) y sacárido capsular del serogrupo W de *N. meningitidis* (MenW) conjugados por separado con el mismo tipo de proteína de vehículo, en la que:

(a) MenA o MenA y MenC se conjugan con la proteína de vehículo mediante un grupo carboxilo en el vehículo proteínico y un conector ADH, en la que el sacárido capsular o cada sacárido capsular conjugado mediante el conector ADH se conjuga con el conector con química de CDAP y la proteína de vehículo se conjuga con el conector ADH con química de EDAC, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 1:2-1:5;

(b) los sacáridos de *N. meningitidis* de MenC, MenY y MenW distintos de (a), se conjugan con la proteína de vehículo mediante un grupo amino en el vehículo proteínico, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 5:1-1:1,99; y

5

(c) la proteína de vehículo es TT.

La composición inmunógena comprende sacárido MenW, en la que la relación de sacárido Men W a proteína de vehículo es entre 5:1-1:1,99, por ejemplo, entre 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,8, 1:1-1:1,7, 1:1,2-1:1,6 o 1:1,4-1:1,5 (p/p). La composición inmunógena comprende sacárido MenY, en la que la relación de sacárido Men Y a proteína de vehículo es entre 5:1-1:1,99, por ejemplo, entre 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,9, 1:1-1:1,8, 1:1,1-1:1,6 o 1:1,3-1:1,4 (p/p). La composición inmunógena comprende sacárido MenA, en la que la relación de sacárido Men A a proteína de vehículo es entre 1:2-1:5, por ejemplo, entre 1:2,4-1:4, 1:2,7-1:3,5 o 1:2,9-1:3,1 (p/p). En un aspecto adicional, la composición inmunógena comprende sacárido MenC, en la que la relación de sacárido Men C a proteína de vehículo es entre 5:1-1:1,99, por ejemplo, entre 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,8, 1,3:1-1:1,6, 1,2:1-1:1,4 o 1,1:1-1:1,2 (p/p), o entre 1:2-1:5, por ejemplo, entre 1:2,5-1:4,5, 1:2,7-1:4,3, 1,3-1,4 o 1:3,3-1:3,5 (p/p).

10

15

Más específicamente, el primer grupo puede consistir en MenA y MenC, y el segundo grupo consiste en MenC, MenY y MenW. Las composiciones inmunógenas particulares divulgadas son aquellas que comprenden: sacárido capsular MenA en la que la relación de sacárido Men A a proteína de vehículo es entre 1:2-1:5, 1:2,4-1:4, 1:2,7-1:3,5 o 1:2,9-1:3,1 (p/p) [que se conjuga mediante un conector ADH a la proteína de vehículo] y sacárido capsular MenC en la que la relación de sacárido Men C a proteína de vehículo es entre 5:1-1:1,99, 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,8, 1,3:1-1:1,6, 1,2:1-1:1,4 o 1,1:1-1:1,2 (p/p) [que se conjuga directamente a la proteína de vehículo]; sacárido capsular MenC en la que la relación de sacárido Men C a proteína de vehículo es entre 1:2-1:5, 1:2,4-1:4, 1:2,7-1:3,5 o 1:2,9-1:3,1 (p/p) [que se conjuga mediante un conector a la proteína de vehículo] y sacárido capsular MenY en la que la relación de sacárido Men Y a proteína de vehículo es entre 5:1-1:1,99, 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,8, 1,3:1-1:1,6, 1,2:1-1:1,4 o 1,1:1-1:1,2 (p/p) [que se conjuga directamente a la proteína de vehículo]; sacáridos capsulares MenA y MenC en la que la relación de sacárido Men A y C a la proteína o proteínas de vehículo es entre 1:2-1:5, 1:2,4-1:4, 1:2,7-1:3,5 o 1:2,9-1:3,1 (p/p) [y que se conjugan mediante un conector a la una o más proteínas de vehículo] y sacáridos capsulares MenY y Men W en las que la relación de sacárido Men Y y W a la proteína de vehículo es entre 5:1-1:1,99, 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,8, 1,3:1-1:1,6, 1,2:1-1:1,4 o 1,1:1-1:1,2 (p/p) [y que se conjugan directamente a la una o más proteínas de vehículo]; sacárido capsular MenA en la que la relación de sacárido Men A a proteína de vehículo es entre 1:2-1:5, 1:2,4-1:4, 1:2,7-1:3,5 o 1:2,9-1:3,1 (p/p) [que se conjuga mediante un conector a la proteína de vehículo] y sacáridos capsulares MenC, MenY y Men W en las que la relación de sacárido Men Y y W y C a la proteína de vehículo es entre 5:1-1:1,99, 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,8, 1,3:1-1:1,6, 1,2:1-1:1,4 o 1,1:1-1:1,2 (p/p) [y que se conjugan directamente a la una o más proteínas de vehículo]. En cualquiera de estas realizaciones, también puede incluirse un conjugado Hib, que se une a una proteína de vehículo (véase la lista de vehículos anterior y posterior, por ejemplo, TT, y para relaciones de sacárido:proteína) directamente o mediante un conector.

20

25

30

35

40

45

El término "sacárido" en toda esta memoria descriptiva puede indicar polisacárido u oligosacárido e incluye ambos. Los polisacáridos se aíslan de bacterias o se aíslan de bacterias y se cambian de tamaño en algún grado por métodos conocidos (véanse, por ejemplo, los documentos EP497524 y EP497525) y opcionalmente por microfluidización. Los polisacáridos pueden cambiarse de tamaño para reducir la viscosidad en las muestras de polisacárido y/o para mejorar la capacidad de filtración para productos conjugados. Los oligosacáridos tienen un bajo número de unidades de repetición (típicamente 5-30 unidades de repetición) y típicamente son polisacáridos hidrolizados.

Cada sacárido capsular de *N. meningitidis* (y/o Hib) puede conjugarse con la proteína de vehículo TT independientemente. En un caso, Hib también se conjuga con la proteína de vehículo TT.

50

Los sacáridos podrían conjugarse con la misma molécula del vehículo proteínico. Los sacáridos pueden conjugarse cada uno por separado a diferentes moléculas del vehículo proteínico TT (teniendo cada molécula de vehículo proteínico únicamente un tipo de sacárido conjugado con el mismo).

También se divulga una composición inmunógena que comprende al menos 2 sacáridos diferentes conjugados por separado con el mismo de proteína de vehículo, en la que uno o más sacáridos se conjugan con la proteína de vehículo, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 1:2-1:5 [un relación alta], y uno o más sacáridos diferentes se conjugan con la proteína de vehículo, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 5:1-1:1,99 [una relación baja].

55

Por "conjugado por separado con el mismo tipo de proteína de vehículo", se entiende que los sacáridos se conjugan con el mismo vehículo individualmente (es decir, no se conjugan diferentes sacáridos con la misma molécula del mismo vehículo proteínico).

60

El uno o más sacáridos capsulares de *N. meningitidis* se conjugan todos con la proteína de vehículo TT.

65

Los sacáridos de relación alta (1:2-1:5) y de relación baja (5:1-1:1,99) pueden comprender además sacáridos seleccionados de un grupo que consiste en: sacárido de tipo B de *H. influenzae* (Hib), sacárido capsular de grupo I de

*Streptococcus* de grupo B, sacárido capsular de grupo II de *Streptococcus* de grupo B, sacárido capsular de grupo III de *Streptococcus* de grupo B, sacárido capsular de grupo IV de *Streptococcus* de grupo B, sacárido capsular de grupo V de *Streptococcus* de grupo B, sacárido capsular de tipo 5 de *Staphylococcus aureus*, sacárido capsular de tipo 8 de *Staphylococcus aureus*, sacárido Vi de *Salmonella typhi*, LPS de *N. meningitidis* (tal como L3 y/o L2), LPS de *M. catarrhalis*, LPS de *H. influenzae* y de cualquiera de los sacáridos capsulares de neumococos tales como del serotipo: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F o 33F.

En una realización, MenC es un sacárido de relación alta; en otra, MenC es un sacárido de relación baja; en otro caso, Hib es un sacárido de relación alta. Las vacunas que comprenden MenA/C/W/Y pueden ser de relación alta/alta/baja/baja, respectivamente, y las vacunas que comprenden MenA/C/W/Y pueden ser de relación alta/baja/baja/baja, respectivamente.

### Consideraciones generales en los aspectos de la invención

Los sacáridos de *N. meningitidis* de la invención se conjugan con la proteína de vehículo TT. Otros sacáridos (en particular el sacárido capsular Hib) que también pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas (inmunógenas) se conjugan con una proteína de vehículo tal como toxoide tetánico (TT), fragmento C de toxoide tetánico, mutantes no tóxicos de toxina tetánica [obsérvese que todas estas variantes de TT se consideran el mismo tipo de proteína de vehículo para los fines de esta invención], toxoide diftérico (DT), CRM197, otros mutantes no tóxicos de toxina diftérica [tales como CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida et al., J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; eliminación o mutación de Glu-148 en Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 en Gly y otras mutaciones divulgadas en el documento US 4709017 o en el documento US 4950740; mutación de al menos uno o más restos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones divulgadas en el documento US 5917017 o en el documento US 6455673; o el fragmento divulgado en el documento US 5843711] (obsérvese que todas estas variantes de DT se consideran el mismo tipo de proteína de vehículo para los fines de esta invención), neumolisina de neumococos (Kuo et al., (1995) Infect Immun 63; 2706-13), OMPC (proteína de membrana exterior de meningococos, habitualmente extraída del serogrupo B de *N. meningitidis* - documento EP0372501), péptidos sintéticos (documentos EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas pertúsicas (documentos WO 98/58668, EP0471177), citocinas, linfocinas, factores del crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4+ humanos de diversos antígenos derivados de patógeno (Falugi et al., (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) tal como la proteína N19 (Baraldoi et al., (2004) Infect Immun 72; 4884-7) proteína PspA de superficie de neumococos (documento WO 02/091998), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761) o proteína D (documentos EP594610 y WO 00/56360).

Opcionalmente Hib también se conjuga con TT.

En un caso, la composición inmunógena comprende un sacárido Hib conjugado con una proteína de vehículo seleccionada del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT y proteína D.

La composición inmunógena opcionalmente comprende un conjugado de sacárido Hib que tiene una relación de Hib a proteína de vehículo de entre 1:5 y 5:1; 1:2 y 2:1; 1:1 y 1:4; 1:2 y 1:3,5; o de aproximadamente o exactamente de 1:2,5 o 1:3 (p/p).

En una composición inmunógena de la invención, MenA o MenA y MenC se conjugan con la proteína de vehículo TT mediante un conector ADH. En un caso, la composición inmunógena el sacárido Hib se conjuga con la proteína de vehículo mediante un conector, por ejemplo, un conector bifuncional. El conector es opcionalmente heterobifuncional u homobifuncional, que tiene, por ejemplo, un grupo amino reactivo y un grupo de ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amino reactivos o dos grupos ácido carboxílico reactivos. El conector tiene, por ejemplo, entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un posible conector es ADH. Otros conectores incluyen B-propionamido (documento WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gevert et al., (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), haluros de haloalquilo (documento US4057685), enlaces glucosídicos (documentos US4673574, US4808700), hexano diamina y ácido 6-aminocaproico (documento US4459286).

MenA o MenA y MenC se conjugan con la proteína de vehículo mediante un grupo carboxílico en el vehículo proteínico y un conector ADH, en la que el sacárido capsular o cada sacárido capsular conjugado mediante el conector ADH se conjuga con el conector con química de CDAP y la proteína de vehículo se conjuga con el conector ADH con química de EDAC, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 1:2-1:5. Los restantes MenC, MenY y MenW no conjugados mediante conector se conjugan con la proteína de vehículo mediante un grupo amino en el vehículo proteínico, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 5:1-1:1,99. El método de conjugación para MenC, MenY y MenW depende de la activación del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El sacárido activado, por tanto, puede acoplarse directamente o mediante un grupo espaciador (conector) con un grupo amino en la proteína de vehículo. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para dar un polisacárido tiolado que podría acoplarse al vehículo mediante un enlace tioéter obtenido después de reacción con una proteína de vehículo activada con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína

de vehículo holoacetilada (por ejemplo, usando yodoacetimida o bromoacetatobromoacetato de N-succinimidilo). Para MenA o MenA y MenC, el éster de cianato (preparado por química de CDAP) se acopla con ADH y el sacárido derivatizado con amino se conjuga con la proteína de vehículo usando química de carbodiimida (EDAC) mediante un grupo carboxilo en el vehículo proteínico. Dichos conjugados se describen en la solicitud publicada PCT WO 93/15760 Uniformed Services University y los documentos WO 95/08348 y WO 96/29094.

Los conjugados también pueden prepararse por métodos de aminación reductora directa como se describe en el documento US 4365170 (Jennings) y en el documento US 4673574 (Anderson). Se describen otros métodos en los documentos EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508.

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

El sacárido capsular Hib se conjuga con el conector en primer lugar antes de que el conector se conjugue con la proteína de vehículo. Como alternativa, el conector puede conjugarse con el vehículo antes de la conjugación con el sacárido.

En general, pueden usarse los siguientes tipos de grupos químicos en un vehículo proteínico para el acoplamiento/conjugación:

A) Carboxilo (por ejemplo, mediante ácido aspártico o ácido glutámico). En una realización, este grupo se une a grupos amino en sacáridos directamente o a un grupo amino en un conector con química de carbodiimida, por ejemplo, con EDAC.

B) Grupo amino (por ejemplo, mediante lisina). En una realización, este grupo se une a grupos carboxilo en sacáridos directamente o a un grupo carboxilo en un conector con química de carbodiimida, por ejemplo, con EDAC. En otra realización, este grupo se une a grupos hidroxilo activados con CDAP o CNBr en sacáridos directamente o a dichos grupos en un conector; a sacáridos o conectores que tienen un grupo aldehído; a sacáridos o conectores que tienen un grupo éster de succinimida.

C) Sulfhidrilo (por ejemplo, mediante cisteína). En una realización, este grupo se une a un sacárido bromo o cloro acetilado o conector con química de maleimida. En una realización, este grupo se activa/modifica con bis diazobenzidina.

D) Grupo hidroxilo (por ejemplo, mediante tirosina). En una realización, este grupo se activa/modifica con bis diazobenzidina.

E) Grupo imidazolilo (por ejemplo, mediante histidina). En una realización, este grupo se activa/modifica con bis diazobenzidina.

F) Grupo guanidilo (por ejemplo, mediante arginina).

G) Grupo indolilo (por ejemplo, mediante triptófano).

En un sacárido, en general pueden usarse los siguientes grupos para un acoplamiento: OH, COOH o NH<sub>2</sub>. Los grupos aldehído pueden generarse después de diferentes tratamientos conocidos en la técnica, tales como: peryodato, hidrólisis ácida, peróxido de hidrógeno, etc.

*Estrategias de acoplamiento directo:*

Sacárido-OH + CNBr o CDAP > éster de cianato + NH<sub>2</sub>-Prot ----> conjugado  
 Sacárido-aldehído + NH<sub>2</sub>-Prot ----> base de Schiff + NaCNBH<sub>3</sub> ----> conjugado  
 Sacárido-COOH + NH<sub>2</sub>-Prot + EDAC ----> conjugado  
 Sacárido-NH<sub>2</sub> + COOH-Prot + EDAC ----> conjugado

*Estrategias de acoplamiento indirecto mediante espaciador (conector):*

Sacárido-OH + CNBr o CDAP ----> éster de cianato + NH<sub>2</sub>---NH<sub>2</sub> ----> sacárido-NH<sub>2</sub> + COOH-Prot + EDAC  
 ----> conjugado  
 Sacárido-OH + CNBr o CDAP ----> éster de cianato + NH<sub>2</sub> SH > sacárido----SH + SH-Prot (proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida después de modificación de grupos amino de la proteína por SPDP, por ejemplo) > sacárido-S-S-Prot  
 Sacárido-OH + CNBr o CDAP ----> éster de cianato + NH<sub>2</sub>---SH > sacárido----SH + maleimida-Prot (modificación de grupos amino) ----> conjugado  
 Sacárido-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub> NH<sub>2</sub> ----> sacárido NH<sub>2</sub> + EDAC + COOH-Prot ----> conjugado

Sacárido-COOH + EDAC+ NH<sub>2</sub>----SH ----> sacárido---SH + SH-Prot (proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida después de modificación de grupos amino de la proteína por SPDP, por ejemplo) > sacárido-S-S-Prot  
 Sacárido-COOH + EDAC+ NH<sub>2</sub>----SH > sacárido----SH + maleimida-Prot (modificación de grupos amina) ----> conjugado

5 Sacárido-Aldehído + NH<sub>2</sub>----NH<sub>2</sub> ----> sacárido---NH<sub>2</sub> + EDAC + COOH-Prot ----> conjugado

Nota: En lugar de EDAC anterior, puede usarse cualquier carbodiimida adecuada.

En resumen, los tipos de grupo químico de vehículo proteínico que en general pueden usarse para acoplamiento con un sacárido son grupos amino (por ejemplo, en restos de lisina), grupos COOH (por ejemplo, en restos de ácido aspártico y glutámico) y grupos SH (si están accesibles) (por ejemplo, en restos de cisteína). Una composición inmunógena de la invención es una que comprende sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis* (MenA), sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC), sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis* (MenY) y sacárido capsular del serogrupo W de *N. meningitidis* (MenW) conjugados por separado con el mismo tipo de proteína de vehículo, en la que:

15 (a) MenA o MenA y MenC se conjugan con la proteína de vehículo mediante un grupo carboxilo en el vehículo proteínico y un conector ADH, en la que el sacárido capsular o cada sacárido capsular conjugado mediante el conector ADH se conjuga con el conector con química de CDAP y la proteína de vehículo se conjuga con el conector ADH con química de EDAC, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 1:2-1:5;

20 (b) los sacáridos de *N. meningitidis* de MenC, MenY y MenW distintos de (a), se conjugan con la proteína de vehículo mediante un grupo amino en el vehículo proteínico, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 5:1-1:1,99; y

25 (c) la proteína de vehículo es TT.

En un caso, el sacárido Hib, cuando está presente, se conjuga con la proteína de vehículo usando CNBr o CDAP, o una combinación de CDAP y química de carbodiimida (tal como EDAC), o una combinación de CNBr y química de carbodiimida (tal como EDAC). Opcionalmente, Hib se conjuga usando CNBr y química de carbodiimida, opcionalmente EDAC. Por ejemplo, CNBr se usa para unir el sacárido y el conector y después se usa química de carbodiimida para unir el conector al vehículo proteínico.

En una realización, MenA; o MenA y MenC se conjugan con una proteína de vehículo (por ejemplo, toxoide tetánico) mediante un conector.

MenA o MenA y MenC se conjugan con proteína de vehículo TT mediante un conector ADH usando CDAP y EDAC. Opcionalmente, la conjugación mediante un conector produce una relación de sacárido a proteína de vehículo entre 1:0,5 y 1:6; 1:1 y 1:5 o 1:2 y 1:4, para MenA; o MenA y MenC.

Una consideración adicional en una vacuna de combinación que comprende diversos sacáridos conjugados con el mismo vehículo es la cuestión de la inmunosupresión del vehículo: puede usarse demasiado vehículo y puede mitigarse la respuesta inmunitaria. Con una estrategia uniforme para la conjugación, el vehículo presentará una mezcla similar de epítomos de linfocitos B y T al sistema inmunitario. Sin embargo, si la conjugación tiene lugar en diferentes grupos químicos dentro de la proteína de vehículo para un sacárido frente a otro, los vehículos proteínicos probablemente serán diferentes en alguna medida en cuanto a la manera de presentarse a sí mismos al sistema inmunitario.

Por consiguiente, también se divulga una composición inmunógena que comprende al menos 2 sacáridos diferentes conjugados por separado al mismo tipo de proteína de vehículo (por ejemplo, toxoide tetánico), en la que uno o más sacáridos se conjugan con la proteína de vehículo mediante un primer tipo de grupo químico en el vehículo proteínico, y uno o más sacáridos se conjugan con la proteína de vehículo mediante un segundo (diferente) tipo de grupo químico en el vehículo proteínico.

El primer y el segundo tipo de grupo químico puede estar presente en el vehículo proteínico en un primer y segundo conjunto de aminoácidos mutuamente excluyentes del vehículo proteínico (por ejemplo, determinados restos de ácido aspártico/ácido glutámico en un conjunto y determinados restos de lisina/arginina en el segundo). Un sacárido puede conjugarse con un grupo carboxilo en el vehículo, y otro en un grupo amino, por ejemplo. Dicha conjugación puede implicar la conjugación en epítomos de linfocitos B y/o T distintos, para cada conjugado diferente.

Por ejemplo, en una vacuna MenAC, MenA puede unirse a un primer tipo de grupo químico (tal como carboxilo) en la proteína de vehículo y MenC unirse a un segundo (tal como amino). En una vacuna de MenCY, MenC puede unirse a un primer tipo de grupo químico (tal como carboxilo) en la proteína de vehículo y MenY unirse a un segundo (tal como amino). En una vacuna MenACWY, MenAC puede unirse a un primer tipo de grupo químico (tal como carboxilo) en la proteína de vehículo y MenWY unirse a un segundo (tal como amino), o MenA puede unirse a un primer tipo de grupo químico (tal como carboxilo) en la proteína de vehículo y MenCWY unirse a un segundo (tal como amino).

En un caso, los 2 conjugados pueden implicar el mismo tipo de sacárido unido al mismo tipo de vehículo, pero mediante químicas de conjugación diferentes. En un caso alternativo, se conjugan 2 sacáridos diferentes con diferentes grupos en el vehículo proteínico. Por "conjugado por separado al mismo tipo de proteína de vehículo" se entiende que los sacáridos se conjugan al mismo vehículo individualmente (es decir, tanto el primer como el segundo grupo químico en la misma molécula del vehículo proteínico no se usan para conjugar los restos sacáridos, en su lugar el primer grupo químico en una primera alícuota de vehículo proteínico se usa con respecto a la conjugación del primer sacárido, y un segundo grupo químico en una segunda alícuota del vehículo proteínico se usa con respecto a la conjugación de un segundo sacárido).

En un caso, el primer y el segundo tipo de grupo químico en el vehículo proteínico están presentes en epítomos de linfocitos B y/o T distintos en la proteína de vehículo. Es decir, están presentes en un conjunto diferente de epítomos de linfocitos B y/o T entre sí. Para predecir los epítomos de linfocitos B para un vehículo, pueden usarse métodos conocidos tales como cualquiera de o los dos siguientes dos métodos: predicción de estructura 2D y/o predicción de índice antigénico. La predicción de estructura 2D puede hacerse usando el programa PSIPRED (de David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, RU). El índice antigénico puede calcularse basándose en el método descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]). El parámetro usado en este programa es el índice antigénico y la longitud mínima para un péptido antigénico. Un índice antigénico de 0,9 para un mínimo de 5 aminoácidos consecutivos puede usarse como umbrales en el programa. Los epítomos de linfocitos T auxiliares son péptidos unidos a moléculas HLA de clase II y reconocidos por linfocitos T auxiliares. La predicción de epítomos de linfocitos T auxiliares útiles puede basarse en técnicas conocidas, tales como el método TEPITOPE descrito por Sturniolo et al. (Nature Biotech. 17: 555-561 [1999]).

El primer y el segundo grupo químico presentes en el vehículo proteínico son opcionalmente diferentes entre sí e idealmente son grupos químicos naturales que pueden usarse fácilmente con fines de conjugación. Pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en: grupos carboxilo, grupos amino, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo, grupos imidazolilo, grupos guanidilo y grupos indolilo. En un caso, el primer grupo químico es carboxilo y el segundo es amino, o viceversa. Estos grupos se explican en mayor detalle anteriormente.

En un caso específico, la composición inmunógena comprende al menos 2 sacáridos capsulares de *N. meningitidis* diferentes, en la que uno o más se seleccionan de un primer grupo que consiste en MenA y MenC que se conjugan con la proteína de vehículo mediante el primer tipo de grupo químico en el vehículo proteínico (por ejemplo, carboxilo) y uno o más sacáridos diferentes se seleccionan de un segundo grupo que consiste en MenC, MenY y MenW que se conjugan con la proteína de vehículo mediante el segundo tipo de grupo químico en el vehículo proteínico (por ejemplo, amino).

En un caso adicional, la composición inmunógena de la invención comprende MenA conjugado mediante el primer tipo de grupo químico (por ejemplo, carboxilo) y MenC conjugado mediante el segundo tipo de grupo químico (por ejemplo, amino).

En un caso, la composición inmunógena comprende MenC conjugado mediante el primer tipo de grupo químico (por ejemplo, carboxilo) y MenY conjugado mediante el segundo tipo de grupo químico (por ejemplo, amino).

En otro caso, la composición inmunógena comprende MenA conjugado mediante el primer tipo de grupo químico (por ejemplo, carboxilo) y MenC, MenY y MenW conjugados mediante el segundo tipo de grupo químico (por ejemplo, amino).

En un caso, la composición inmunógena comprende MenA y MenC conjugados mediante el primer tipo de grupo químico (por ejemplo, carboxilo) y MenY y MenW conjugados mediante el segundo tipo de grupo químico (por ejemplo, amino).

En cualquiera de los casos anteriores, Hib también puede estar presente también conjugado con el mismo tipo de vehículo proteínico. Hib puede conjugarse con el vehículo mediante el primer o el segundo tipo de grupo químico. En una realización, se conjuga mediante un grupo carboxilo.

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

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

En una realización, el sacárido capsular MenW está al menos parcialmente O-acetilado de modo que al menos un



30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o un 98 % de las unidades de repetición están O-acetiladas al menos en una o dos posiciones. La O-acetilación está presente, por ejemplo, al menos en la posición O-7 y/u O-9 de al menos un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o un 98 % de las unidades de repetición.

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

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

15 La composición inmunógena de la invención comprende opcionalmente uno o más conjugados de sacárido, en la que el tamaño promedio de cada sacárido antes de la conjugación está por encima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa o 130 kDa. En una realización, el conjugado después de la conjugación debe ser fácilmente filtrable a través de un filtro de 0,2 micrómetros de modo que se obtenga un rendimiento de más de un 50, 60, 70, 80, 90 o 95 % después de la filtración en comparación con la muestra antes de la filtración.

20 En particular, la composición inmunógena de la invención comprende sacáridos capsulares de *N. meningitidis* de los serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína de vehículo, en la que el tamaño promedio (peso molecular promedio en peso; Mw) de al menos uno, dos, tres o cuatro o cada sacárido de *N. meningitidis* está por encima de 50 kDa, 60 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa o 130 kDa.

25 La composición inmunógena puede comprender sacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína de vehículo, en la que al menos uno, dos, tres o cuatro o cada sacárido de *N. meningitidis* es un sacárido nativo o se ha cambiado de tamaño en un factor de hasta x 1,5, x 2, x 3, x 4, x 5, x 6, x 7, x 8, x 9 o x 10 con respecto al peso molecular promedio en peso del polisacárido nativo.

30 Para los fines de la invención, "polisacárido nativo" se refiere a un sacárido que no se ha sometido a un proceso, cuyo fin es reducir el tamaño del sacárido. Un polisacárido puede llegar a reducirse ligeramente en su tamaño durante procedimientos de purificación normales. Dicho sacárido aún es nativo. Únicamente si el polisacárido se ha sometido a técnicas de cambio de tamaño, el polisacárido no se consideraría nativo.

35 Para los fines de la invención, "cambiado de tamaño en un factor de hasta x 2" significa que el sacárido se somete a un proceso destinado a reducir el tamaño del sacárido, pero para retener un tamaño de más de la mitad del tamaño del polisacárido nativo. x 3, x 4 etc. deben interpretarse de la misma manera, es decir, el sacárido se somete a un proceso destinado a reducir el tamaño del polisacárido, pero para retener un tamaño de más de un tercio, un cuarto, etc. del tamaño del polisacárido nativo.

40 En un aspecto de la invención, la composición inmunógena comprende sacáridos capsulares de *N. meningitidis* de los serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína de vehículo, en la que al menos uno, dos, tres o cuatro o cada sacárido de *N. meningitidis* es polisacárido nativo.

45 En un aspecto de la invención, la composición inmunógena comprende sacáridos capsulares de *N. meningitidis* de los serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína de vehículo, en la que al menos uno, dos, tres o cuatro o cada sacárido de *N. meningitidis* está cambiado de tamaño en un factor de hasta x 2, x 3, x 4, x 5, x 6, x 7, x 8, x 9 o x 10.

50 En una realización, el tamaño promedio de al menos uno, dos, tres, cuatro o cada sacárido de *N. meningitidis* es entre 50 kDa y 1500 kDa, 50 kDa y 500 kDa, 50 kDa y 300 kDa, 101 kDa y 1500 kDa, 101 kDa y 500 kDa, 101 kDa y 300 kDa como se determina por MALLS.

55 En una realización, el sacárido MenA tiene un peso molecular de 50-500 kDa, 50-100 kDa, 100-500 kDa, 55-90 kDa, 60-70 kDa o 70-80 kDa o 60-80 kDa por MALLS.

60 En una realización, el sacárido MenC tiene un peso molecular de 100-200 kDa, 50-100 kDa, 100-150 kDa, 101-130 kDa, 150-210 kDa o 180-210 kDa por MALLS.

65 En una realización, el sacárido MenY tiene un peso molecular de 60-190 kDa, 70-180 kDa, 80-170 kDa, 90-160 kDa, 100-150 kDa o 110-140 kDa, 50-100 kDa, 100-140 kDa, 140-170 kDa o 150-160 kDa por MALLS.

En una realización, el sacárido MenW tiene un peso molecular de 60-190 kDa, 70-180 kDa, 80-170 kDa, 90-160 kDa, 100-150 kDa, 110-140 kDa, 50-100 kDa o 120-140 kDa por MALLS.

El peso molecular o peso molecular promedio de un sacárido en este documento se refiere al peso molecular promedio en peso (Mw) del sacárido medido antes de la conjugación y se mide por MALLS.

5 La técnica MALLS es bien conocida en la técnica y se realiza típicamente como se describe en el ejemplo 2. Para el análisis MALLS de sacáridos de meningococos, pueden usarse dos columnas (TSKG6000 y 5000PWxl TOSOH Bioscience) en combinación y los sacáridos se eluyen en agua. Los sacáridos se detectan usando un detector de dispersión de luz (por ejemplo, Wyatt Dawn DSP equipado con un láser de argón de 10 mW a 488 nm) y un refractómetro interferométrico (por ejemplo, Wyatt Otilab DSP equipado con una celda P100 y un filtro rojo a 498 nm).

10 En una realización, los sacáridos de *N. meningitidis* son polisacáridos nativos o polisacáridos nativos que se han reducido en su tamaño durante un proceso de extracción normal.

15 En una realización, los sacáridos de *N. meningitidis* se cambian de tamaño por escisión mecánica, por ejemplo, por microfluidización o sonicación. La microfluidización y la sonicación tienen la ventaja de disminuir el tamaño de los polisacáridos nativos más grandes suficientemente para proporcionar un conjugado filtrable. El cambio de tamaño es en un factor de no más de x 20, x 10, x 8, x 6, x 5, x 4, x3 o x2.

20 En una realización, la composición inmunógena comprende conjugados de *N. meningitidis* que se preparan a partir de una mezcla de polisacáridos nativos y sacáridos que se cambian de tamaño en un factor de no más de x 20. Por ejemplo, los sacáridos de MenC y/o MenA son nativos. Por ejemplo, los sacáridos de MenY y/o MenW se cambian de tamaño en un factor de no más de x 20, x 10, x 8, x 6, x 5, x 4, x3 o x2. Por ejemplo, una composición inmunógena contiene un conjugado preparado a partir de MenY y/o MenW y/o MenC y/o MenA que se cambia de tamaño en un factor de no más de x 10 y/o se microfluidiza. Por ejemplo, una composición inmunógena contiene un conjugado preparado a partir de MenA y/o MenC y/o MenW y/o MenY. Por ejemplo, una composición inmunógena comprende un conjugado preparado a partir de MenC nativo. Por ejemplo, una composición inmunógena comprende un conjugado preparado a partir de MenC y MenA nativo que se cambia de tamaño en un factor de no más de x 10 y/o se microfluidiza. Por ejemplo, una composición inmunógena comprende un conjugado preparado a partir de MenC y MenY nativo que se cambia de tamaño en un factor de no más de x 10 y/o se microfluidiza.

30 En una realización, la polidispersidad del sacárido es de 1-1,5, 1-1,3, 1-1,2, 1-1,1 o 1-1,05 y después de la conjugación con una proteína de vehículo, la polidispersidad del conjugado es de 1,0-2,5, 1,0-2,0, 1,0-1,5, 1,0-1,2, 1,5-2,5, 1,7-2,2 o 1,5-2,0. Todas las mediciones de polidispersidad son por MALLS.

35 Los sacáridos se cambian de tamaño opcionalmente hasta 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 veces del tamaño del polisacárido aislado de las bacterias.

40 En una realización, cada sacárido de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo o se ha cambiado de tamaño en un factor de no más de x 10. En una realización adicional, cada sacárido capsular de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo. En una realización adicional, al menos uno, dos, tres o cuatro sacáridos capsulares de *N. meningitidis* se cambia de tamaño por microfluidización. En una realización adicional, cada sacárido capsular de *N. meningitidis* se cambia de tamaño en un factor de no más de x 10. En una realización adicional, los conjugados de *N. meningitidis* se preparan a partir de una mezcla de polisacáridos nativos y sacáridos que se cambian de tamaño en un factor de no más de x 10. En una realización adicional, el sacárido capsular del serogrupo Y se cambia de tamaño en un factor de no más de x 10. En una realización adicional, los sacáridos capsulares de los serogrupos A y C son polisacáridos nativos y los sacáridos de los serogrupos W135 e Y se cambian de tamaño en un factor de no más de x 10. En una realización adicional, el tamaño promedio de cada sacárido capsular de *N. meningitidis* es entre 50 kDa y 300 kDa o 50 kDa y 200 kDa. En una realización adicional, la composición inmunógena comprende un sacárido capsular MenA que tiene un tamaño promedio por encima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa o un tamaño promedio entre 50-100 kDa o 55-90 kDa o 60-80 kDa. En una realización adicional, la composición inmunógena comprende un sacárido capsular MenC que tiene un tamaño promedio por encima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa o entre 100-200 kDa, 100-150 kDa, 80-120 kDa, 90-110 kDa, 150-200 kDa, 120-240 kDa, 140-220 kDa, 160-200 kDa o 190-200 kDa. En una realización adicional, la composición inmunógena comprende un sacárido capsular MenY, que tiene un tamaño promedio por encima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa o entre 60-190 kDa o 70-180 kDa u 80-170 kDa o 90-160 kDa o 100-150 kDa, 110-145 kDa o 120-140 kDa. En una realización adicional, la composición inmunógena comprende un sacárido capsular MenW que tiene un tamaño promedio por encima de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa o entre 60-190 kDa o 70-180 kDa u 80-170 kDa o 90-160 kDa o 100-150 kDa, 140-180 kDa, 150-170 kDa o 110-140 kDa.

60 La composición inmunógena de la invención puede comprender un sacárido capsular de *H. influenzae* b (Hib) conjugado con una proteína de vehículo. Este puede conjugarse con una proteína de vehículo selecciona del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT y proteína D, por ejemplo, TT. El sacárido Hib puede conjugarse con la misma proteína de vehículo que para al menos uno, dos, tres o todos los conjugados de sacárido capsular de *N. meningitidis*, por ejemplo, TT. La relación de Hib a proteína de vehículo en el conjugado de sacárido capsular Hib puede ser entre 1:5 y 5:1 (p/p), por ejemplo, entre 1:1 y 1:4, 1:2 y 1:3,5 o aproximadamente 1:3 (p/p). El sacárido capsular Hib puede conjugarse con la proteína de vehículo mediante un conector (véase anteriormente). El conector puede ser bifuncional (con dos grupos amino reactivos, tales como ADH, o dos grupos ácido carboxílico reactivos, o un grupo amino reactivo en un extremo y un grupo ácido carboxílico reactivo en el otro extremo). Puede tener entre 4

y 12 átomos de carbono. El sacárido Hib puede conjugarse con la proteína de vehículo o el conector usando CNBr o CDAP. La proteína de vehículo puede conjugarse con el sacárido Hib mediante el conector usando un método que comprende química de carbodiimida, opcionalmente química de EDAC (usando, por tanto, el grupo químico carboxilo en el vehículo). La dosis del conjugado de sacárido Hib puede ser entre 0,1 y 9 µg, 1 y 5 µg o 2 y 3 µg de sacárido.

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

10 La dosis media se determina añadiendo las dosis de todos los sacáridos adicionales y dividiendo por el número de sacáridos adicionales. Los sacáridos adicionales son todos los sacáridos dentro de la composición inmunógena a parte de Hib y pueden incluir sacáridos capsulares de *N. meningitidis*. La "dosis" es la cantidad de composición inmunógena o vacuna que se administra a un ser humano.

15 Un sacárido Hib es el polisacárido capsular polirribosil fosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* de tipo b o un oligosacárido derivado del mismo.

20 "Al menos dos conjugados adicionales de sacárido bacteriano" debe entenderse por dos conjugados adicionales de sacárido bacteriano además de un conjugado de Hib. Los dos conjugados bacterianos adicionales pueden incluir conjugados de sacárido capsular de *N. meningitidis*.

25 Las composiciones inmunógenas de la invención pueden comprender conjugados adicionales de sacárido derivados de uno o más de *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos de grupo A, estreptococos de grupo B, *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*. Un caso adicional comprende sacáridos capsulares derivados de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de sacárido capsular de neumococos se seleccionan opcionalmente de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (opcionalmente de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). Un caso adicional comprende los sacáridos capsulares de tipo 5, tipo 8 o 336 de *Staphylococcus aureus*. Un caso adicional comprende los sacáridos capsulares de tipo I, tipo II o tipo III de *Staphylococcus epidermidis*. Un caso adicional comprende el sacárido Vi de *S. typhi*. Un caso adicional comprende los sacáridos capsulares de tipo Ia, tipo Ic, tipo II, tipo III o tipo V de estreptococos del grupo B. Un caso adicional comprende los sacáridos capsulares de estreptococos del grupo A, comprendiendo opcionalmente además al menos una proteína M y más opcionalmente múltiples tipos de proteína M.

30 Las composiciones inmunógenas también pueden comprender una vacuna DTPa o DTPw (por ejemplo, una que contiene DT, TT y una vacuna antipertúsica de células completas (Pw) o una vacuna antipertúsica acelular (Pa) (que comprende, por ejemplo, toxoide pertúsico, FHA, pertactina, y, opcionalmente, aglutinoginas 2 y 3). Dichas combinaciones también pueden comprender una vacuna contra hepatitis B (por ejemplo, puede comprender el antígeno de superficie de hepatitis B [HepB], opcionalmente adsorbido en fosfato de aluminio). En un caso, la composición inmunógena comprende una vacuna DTPwHepBHibMenAC donde el componente MenAC es como se describe en este documento.

35 En un caso, la composición inmunógena comprende además un antígeno de *N. meningitidis* de serogrupo B. El antígeno es opcionalmente un polisacárido capsular de *N. meningitidis* de serogrupo B (MenB) o un polisacárido cambiado de tamaño u oligosacárido derivado del mismo, que puede conjugarse con un vehículo proteínico. El antígeno es opcionalmente una preparación de vesícula de membrana externa de *N. meningitidis* de serogrupo B como se describe en los documentos EP301992, WO 01/09350, WO 04/14417, WO 04/14418 y WO 04/14419.

40 En general, la composición inmunógena de la invención puede comprender una dosis de cada conjugado de sacárido entre 2 y 20 µg, 3 y 10 µg o 4 y 7 µg de sacárido.

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

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

65 "Alrededor de" o "aproximadamente" se definen como en un 10 % más o menos de la cifra dada para los fines de la invención.

- 5 En un caso, la composición inmunógena puede contener una dosis de sacárido del conjugado de sacárido Hib que es, por ejemplo, de menos de un 90 %, un 80 %, un 75 %, un 70 %, un 60 %, un 50 %, un 40 %, un 30 %, un 20 % o un 10 % de la dosis media de sacárido de al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de sacárido de *N. meningitidis*. La dosis de sacárido del sacárido Hib es, por ejemplo, entre un 20 % y un 60 %, un 30 % y un 60 %, un 40 % y un 60 % o aproximada o exactamente un 50 % de la dosis media de sacárido de al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de sacárido de *N. meningitidis*.
- 10 En un caso, la composición inmunógena contiene una dosis de sacárido del conjugado de sacárido Hib que es, por ejemplo, de menos de un 90 %, un 80 %, un 75 %, un 70 %, un 60 %, un 50 %, un 40 %, un 30 %, un 20 % o un 10 % de la dosis mínima de sacárido de los al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de sacárido de *N. meningitidis*. La dosis de sacárido del sacárido Hib es, por ejemplo, entre un 20 % y un 60 %, un 30 % y un 60 %, un 40 % y un 60 % o aproximada o exactamente un 50 % de la dosis mínima de sacárido de los al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de sacárido de *N. meningitidis*.
- 15 En una realización de la invención, la dosis de sacárido de cada uno de los al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de sacárido de *N. meningitidis* es opcionalmente la misma, o aproximadamente la misma.
- 20 Un aspecto adicional de la invención es una vacuna que comprende la composición inmunógena de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- En una realización, la composición inmunógena de la invención se tampona a, o se ajusta a, entre pH 7,0 y 8,0, pH 7,2 y 7,6 o aproximada o exactamente pH 7,4.
- 25 La composición inmunógena o las vacunas de la invención opcionalmente se liofilizan en presencia de un agente estabilizante, por ejemplo, un poliol tal como sacarosa o trehalosa.
- Opcionalmente, la composición inmunógena o la vacuna de la invención contiene una cantidad de un adyuvante suficiente para potenciar la respuesta inmunitaria contra el inmunógeno. Los adyuvantes adecuados incluyen, aunque sin limitación, sales de aluminio (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), mezclas de escualeno (SAF-1), muramil péptido, derivados de saponina, preparaciones de pared celular micobacteriana, monofosforil lípido A, derivados de ácido micólico, tensioactivos de copolímero de bloque no iónicos, Quil A, subunidad B de la toxina del cólera, polifosfaceno y derivados, y complejos inmunoestimulantes (ISCOM) tales como los descritos por Takahashi et al. (1990) Nature 344:873-875.
- 30
- 35 Para las combinaciones de *N. meningitidis* o HibMen analizadas anteriormente, puede ser ventajoso no usar ningún adyuvante de sal de aluminio o ningún adyuvante en absoluto.
- 40 Como con todas las composiciones inmunógenas o vacunas, las cantidades inmunológicamente eficaces de los inmunógenos deben determinarse empíricamente. Factores a considerar incluyen la inmunogenicidad, vaya el inmunógeno a formar complejos o no con o adherirse covalentemente a un adyuvante o proteína de vehículo u otro vehículo o no, la vía de administración y el número de dosificaciones inmunizantes a administrar.
- 45 El agente activo puede estar presente en cantidades variables en la composición farmacéutica o la vacuna de la invención. Típicamente, la concentración mínima de la sustancia es una cantidad necesaria para conseguir su uso pretendido, mientras que la cantidad máxima es la cantidad máxima que permanecerá en solución o suspendida homogéneamente dentro de la mezcla inicial. Por ejemplo, la cantidad mínima de un agente terapéutico es opcionalmente una que proporcionará una única dosificación terapéuticamente eficaz. Para sustancias bioactivas, la concentración mínima es una cantidad necesaria para la bioactividad tras la reconstitución y la concentración máxima está en el punto en que no puede mantenerse una suspensión homogénea. En el caso de unidades monodosis, la cantidad es la de una única aplicación terapéutica. En general, se espera que cada dosis comprenda 1-100 µg de antígeno proteínico, opcionalmente 5-50 µg o 5-25 µg. Ejemplos de dosis de sacáridos bacterianos son 10-20 µg, 5-10 µg, 2,5-5 µg o 1-2,5 µg de sacárido en el conjugado.
- 50
- 55 Las preparaciones de vacuna de la presente invención pueden ser para su uso en métodos para proteger o tratar a un mamífero (por ejemplo, un paciente humano) susceptible a infección, mediante la administración de dicha vacuna mediante vía sistémica o a la mucosa. Un paciente humano es opcionalmente un lactante menor (menos de 12 meses), un lactante mayor (12-24, 12-16 o 12-14 meses), un niño (2-12, 3-8 o 3-5 años), un adolescente (12-20, 14-20 o 15-19 años) o un adulto. Estas administraciones pueden incluir inyección mediante vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante administración a la mucosa al sistema oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Se prefiere la administración intranasal de vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media (ya que puede evitarse más eficazmente el transporte nasofaríngeo de neumococos, atenuando de este modo la infección en su fase más temprana). Aunque la vacuna de la invención puede administrarse como una única dosis, los componentes de la misma también pueden coadministrarse conjuntamente al mismo tiempo o en diferentes momentos
- 60
- 65 (por ejemplo, si los sacáridos están presentes en una vacuna estos podrían administrarse por separado al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de una vacuna de proteína bacteriana para la coordinación óptima

de las respuestas inmunitarias unas con respecto a las otras). Además de una única vía de administración, pueden usarse 2 vías diferentes de administración. Por ejemplo, los antígenos víricos pueden administrarse ID (por vía intradérmica), mientras que las proteínas bacterianas pueden administrarse IM (por vía intramuscular) o IN (por vía intranasal). Si los sacáridos están presentes, pueden administrarse IM (o ID) y las proteínas bacterianas pueden administrarse IN (o ID). Además, las vacunas de la invención pueden administrarse IM para dosis de sensibilización e IN para dosis de refuerzo.

La preparación de vacuna en general se describe en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación en liposomas se describe por Fullerton, patente de Estados Unidos 4 235 877.

También se divulga un kit de vacuna para la administración concomitante o secuencial que comprende dos composiciones inmunógenas multivalentes para conferir protección en un hospedador contra enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* and *Neisseria meningitidis* y opcionalmente *Haemophilus influenzae*. Por ejemplo, el kit opcionalmente comprende un primer recipiente que comprende uno o más de:

toxoides tetánico (TT),  
toxoides diftérico (DT), y  
componentes pertúsicos de células completas o acelulares  
y un segundo recipiente que comprende:  
una composición inmunógena de la invención como se describe anteriormente (por ejemplo, las que comprenden combinaciones de conjugado de sacárido Men o HibMen).

También se divulga un kit de vacuna para la administración concomitante o secuencial que comprende dos composiciones inmunógenas multivalentes para conferir protección en un hospedador contra enfermedad causada por *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* y opcionalmente *Haemophilus influenzae*. Por ejemplo, el kit opcionalmente comprende un primer recipiente que comprende:

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

y un segundo recipiente que comprende:  
una composición inmunógena de la invención como se describe anteriormente (por ejemplo, las que comprenden combinaciones de conjugado de sacárido Men o HibMen).

Ejemplos del conjugado de Hib y los conjugados de polisacárido de *N. meningitidis* son como se describen anteriormente.

Típicamente, la vacuna contra *Streptococcus pneumoniae* en el kit de vacuna (o en cualquiera de las composiciones inmunógenas de la invención descritas anteriormente) comprenderá antígenos sacáridos (opcionalmente conjugados), en la que los sacáridos se obtienen de al menos cuatro serotipos de neumococos elegidos del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Opcionalmente, los cuatro serotipos incluyen 6B, 14, 19F y 23F. Más opcionalmente, se incluyen al menos 7 serotipos en la composición, por ejemplo, los derivados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Opcionalmente, se incluyen más de 7 serotipos en la composición, por ejemplo, al menos 10, 11, 12, 13 o 14 serotipos. Por ejemplo, la composición en una realización incluye 10 u 11 sacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, y opcionalmente 3 (todos opcionalmente conjugados). En una realización de la invención, se incluyen al menos 13 antígenos sacáridos (opcionalmente conjugados), aunque también se contemplan antígenos sacáridos adicionales, por ejemplo, 23 valentes (tales como los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F) por la invención.

Los sacáridos de neumococos se conjugan independientemente con cualquier proteína de vehículo conocida, por ejemplo, CRM197, toxoide tetánico, toxoide diftérico, proteína D o cualquier otra proteína de vehículo como menciona anteriormente.

Opcionalmente, los kits de vacuna comprenden un tercer componente. Por ejemplo, el kit opcionalmente comprende un primer recipiente que comprende uno o más de:

toxoides tetánico (TT),  
toxoides diftérico (DT), y  
componentes pertúsicos de células completas o acelulares  
y un segundo recipiente que comprende:

uno o más conjugados de una proteína de vehículo y un sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*

[donde el sacárido capsular es opcionalmente de un serotipo de neumococos seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F].

- 5 y un tercer recipiente que comprende:  
una composición inmunógena de la invención como se describe anteriormente (por ejemplo, las que comprenden combinaciones de conjugado de sacárido Men o HibMen).

10 Un aspecto adicional de la invención es un proceso para preparar la composición inmunógena o la vacuna de la invención, que comprende la etapa de mezclar la composición inmunógena de la invención con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona una composición inmunógena de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedad causada por infección por *Neisseria meningitidis*.

15 También se divulga un método de inmunización de un hospedador humano contra enfermedad causada por *N. meningitidis* y opcionalmente infección por *Haemophilus influenzae* que comprende administrar al hospedador una dosis inmunoprotectora de la composición inmunógena o la vacuna o kit de la invención opcionalmente usando una dosis única.

20 También se divulga un método de inmunización de un hospedador humano con una composición inmunógena, en la que una administración de una única dosis (opcionalmente a adolescentes, adultos o niños) da como resultado una prueba sanguínea recogida un mes después de la administración que da respuesta de un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % o un 95 % en un ensayo SBA que mide los niveles de respuesta contra MenA, MenC, MenW y/o MenY. Opcionalmente, el ensayo SBA es como se describe en el ejemplo 9 con respuesta evaluada como se describe en el ejemplo 9.

25 También se divulga una composición inmunógena que comprende conjugados de MenA, MenC, MenW y/o MenY que puede provocar una respuesta inmunitaria después de una única dosis, de modo que más de un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % o un 95 % de los sujetos humanos (niños, adolescentes o adultos) inoculados se clasifican con respuesta en un ensayo SBA en sangre extraída un mes después de la inoculación (opcionalmente usando los criterios descritos en el ejemplo 9).

30 Dicha composición inmunógena opcionalmente tiene las características estructurales adicionales descritas en este documento.

35 La invención se ilustra en los ejemplos adjuntos. Los ejemplos siguientes se realizan usando técnicas convencionales, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la materia, excepto cuando se describa lo contrario en detalle. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

## 40 Ejemplos

### Ejemplo 1 - preparación de conjugados de polisacárido

45 La unión covalente del polisacárido PRP de *Haemophilus influenzae* (Hib) con TT se realizó mediante una química de acoplamiento desarrollada por Chu et al. (Infection and Immunity 1983, 40 (1); 245-256). El polisacárido PRP de Hib se activó añadiendo CNBr e incubando a pH 10,5 durante 6 minutos. El pH se redujo hasta pH 8,75 y se añadió dihidrazida de ácido adípico (ADH) y se continuó la incubación durante 90 minutos más. El PRP activado se acopló a toxoide tetánico purificado mediante condensación de carbodiimida usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). Se añadió EDAC al PRP activado hasta alcanzar una relación final de 0,6 mg de EDAC/mg de PRP activado. El pH se ajustó hasta 5,0 y se añadió toxoide tetánico purificado hasta alcanzar 2 mg de TT/mg de PRP activado. La solución resultante se dejó durante tres días con agitación suave. Después de filtración a través de una membrana de 0,45 µm, el conjugado se purificó en una columna de Sephacryl S500HR (Pharmacia, Suecia) equilibrada en NaCl 0,2 M.

55 Se produjeron conjugados de MenC-TT usando polisacáridos nativos (de más de 150 kDa medido por MALLS) o se microfluidizaron ligeramente. Se produjeron conjugados de MenA-TT usando polisacárido nativo o polisacárido microfluidizado ligeramente de más de 60 kDa medido por el método MALLS del ejemplo 2. Se produjeron conjugados de MenW y MenY-TT usando polisacáridos cambiados de tamaño de aproximadamente 100-200 kDa medido por MALLS (véase el ejemplo 2). El cambio de tamaño fue por microfluidización usando un aparato homogeneizador Emulsiflex C-50. Los polisacáridos entonces se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

60 La activación y el acoplamiento se realizaron como se describe en los documentos WO 96/29094 y WO 00/56360. En resumen, el polisacárido a una concentración de 10-20 mg/ml en NaCl 2 M pH 5,5-6,0 se mezcló con solución de CDAP (100 mg/ml recién preparado en acetonitrilo/WFI, 50/50) hasta una relación final de CDAP/polisacárido de 0,75/1 o 1,5/1. Después de 1,5 minutos, el pH se elevó con hidróxido de sodio hasta pH 10,0. Después de tres minutos, se añadió toxoide tetánico hasta alcanzar una relación de proteína/polisacárido de 1,5/1 para MenW, 1,2/1 para MenY,

1,5/1 para MenA o 1,5/1 para MenC. La reacción continuó durante una a dos horas.

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

#### Ejemplo 1a - preparación de conjugados de polisacárido MenA y MenC de la invención

Se produjeron conjugados de MenC-TT usando polisacáridos nativos (de más de 150 kDa medido por MALLS) o se microfluidizaron ligeramente. Se produjeron conjugados de MenA-TT usando polisacárido nativo o polisacárido microfluidizado ligeramente de más de 60 kDa medido por el método MALLS del ejemplo 2. El cambio de tamaño fue por microfluidización usando un aparato homogeneizador Emulsiflex C-50. Los polisacáridos entonces se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

Para conjugar polisacárido capsular MenA con toxoide tetánico mediante un espaciador, se usó el siguiente método. La unión covalente del polisacárido y el espaciador (ADH) se realizó mediante una química de acoplamiento por la que el polisacárido se activa en condiciones controladas por un agente de cianilación, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP). El espaciador reacciona con el PS cianilado mediante sus grupos hidrazino, para formar un enlace isourea estable entre el espaciador y el polisacárido.

Una solución a 10 mg/ml de MenA (pH 6,0) [3,5 g] se trató con una solución recién preparada a 100 mg/ml de CDAP en acetonitrilo/agua (50/50 (v/v)) para obtener una relación de CDAP/MenA de 0,75 (p/p). Después de 1,5 minutos, el pH se elevó hasta pH 10,0. Tres minutos después, se añadió ADH hasta obtener una relación de ADH/MenA de 8,9. El pH de la solución se disminuyó hasta 8,75 y la reacción prosiguió durante 2 horas manteniendo este pH (con la temperatura mantenida a 25 °C).

La solución de PSAAH se concentró hasta una cuarta parte de su volumen inicial y después se diafiltró con 30 volúmenes de NaCl 0,2 M usando una membrana Filtron Omega con un punto de corte de 10 kDa, y se filtró el retenido.

Antes de la reacción de conjugación (condensación de carbodiimida), la solución de TT purificada y la solución de PSAAH se diluyeron hasta alcanzar una concentración de 10 mg/ml para PSAAH y de 10 mg/ml para TT.

Se añadió EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida) a la solución de PSAH (2 g de sacárido) para alcanzar una relación final de 0,9 mg de EDAC/mg de PSAAH. El pH se ajustó hasta 5,0. El toxoide tetánico purificado se añadió con una bomba peristáltica (en 60 minutos) hasta alcanzar 2 mg de TT/mg de PSAAH. La solución resultante se dejó 60 min a +25 °C en agitación para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 min. La solución se neutralizó mediante la adición de Tris-HCl 1 M pH 7,5 (1/10 del volumen final) y se dejó 30 minutos a +25 °C, después durante una noche a +2 °C hasta +8 °C.

El conjugado se aclaró usando un filtro de 10 µm y se purificó usando una columna de Sephacryl S400HR (Pharmacia, Suecia). La columna se equilibró en Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), NaCl 0,075 M y el conjugado (aprox. 660 ml) se cargó en la columna (+2 °C a +8 °C). La combinación de elución se seleccionó como una función de la densidad óptica a 280 nm. La recogida comenzó cuando la absorbancia aumentó hasta 0,05. La recogida continuó hasta que la Kd alcanzó 0,30. El conjugado se esterilizó en filtro a +20 °C, después se almacenó a +2 °C hasta +8 °C. El conjugado resultante tenía una relación de polisacárido:proteína de 1:2-1:4 (p/p).

Para conjugar polisacárido capsular MenC con toxoide tetánico mediante un espaciador, se usó el siguiente método. La unión covalente del polisacárido y el espaciador (ADH) se realizó mediante una química de acoplamiento por la que el polisacárido se activa en condiciones controladas por un agente de cianilación, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP). El espaciador reacciona con el PS cianilado mediante sus grupos hidrazino, para formar un enlace isourea estable entre el espaciador y el polisacárido.

Una solución a 20 mg/ml de MenC (pH 6,0) (3,5 g) se trató con una solución recién preparada a 100 mg/ml de CDAP en acetonitrilo/agua (50/50 (v/v)) para obtener una relación de CDAP/MenC de 1,5 (p/p). Después de 1,5 minutos, el pH se elevó hasta pH 10,0. En el pH de activación, se añadió NaCl 5 M para conseguir una concentración final de NaCl 2 M. Tres minutos después, se añadió ADH hasta obtener una relación de ADH/MenC de 8,9. El pH de la solución se disminuyó hasta 8,75 y la reacción prosiguió durante 2 horas (retenida a 25 °C).

La solución de PSCAH se concentró hasta un mínimo de 150 ml y después se diafiltró con 30 volúmenes de NaCl 0,2 M usando una membrana Filtron Omega con un punto de corte de 10 kDa, y se filtró el retenido.

Antes de la reacción de conjugación, la solución de TT purificada y la solución de PSCAH (escala de 2 g) se diluyeron en NaCl 0,2 M hasta alcanzar una concentración de 15 mg/ml para PSCAH y 20 mg/ml para TT. El toxoide tetánico purificado se añadió a la solución de PSCAH para alcanzar 2 mg de TT/mg de PSCAH. El pH se ajustó hasta 5,0. se añadió EDAC (16,7 mg/ml en Tris 0,1 M pH 7,5) con una bomba peristáltica (en 10 minutos) hasta alcanzar una relación final de 0,5 mg de EDAC/mg de PSCAH. La solución resultante se dejó 110 min a +25 °C en agitación y

regulación del pH para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 min. La solución entonces se neutralizó mediante adición de Tris-HCl 1 M pH 9,0 (1/10 del volumen final) y se dejó 30 minutos a +25 °C, después durante una noche a +2 °C hasta +8 °C.

El conjugado se aclaró usando un filtro de 10 µm y se purificó usando una columna de Sephacryl S400HR (Pharmacia, Suecia). La columna se equilibró en Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), NaCl 0,075 M y el conjugado (aprox. 460 ml) se cargó en la columna (+2 °C a +8 °C). La combinación de elución se seleccionó como una función de la densidad óptica a 280 nm. La recogida comenzó cuando la absorbancia aumentó hasta 0,05. La recogida continuó hasta que la Kd alcanzó 0,20. El conjugado se esterilizó en filtro a +20 °C, después se almacenó a +2 °C hasta +8 °C. El conjugado resultante tenía una relación de polisacárido:proteína de 1:2-1:4 (p/p).

### Ejemplo 2 - determinación del peso molecular usando MALLS

Se acoplaron detectores a una columna de exclusión por tamaño de HPLC de la que se eluyeron las muestras. Por un lado, el detector de dispersión de luz láser medía las intensidades de luz dispersadas a 16 ángulos por la solución macromolecular y, por otro lado, un refractómetro interferométrico colocado en línea permitía la determinación de la cantidad de muestra eluida. A partir de estas intensidades, puede determinarse el tamaño y la forma de las macromoléculas en solución.

El peso molecular medio en peso ( $M_w$ ) se define como la suma de los pesos de todas las especies multiplicada por su respectivo peso molecular u dividida por la suma de pesos de todas las especies.

a) Peso molecular promedio en peso: - $M_w$ -

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

b) Peso molecular promedio en número: - $M_n$ -

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

c) Media cuadrática del radio: - $R_w$ - y  $R^2_w$  es el cuadrado del radio definido por:

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

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

d) La polidispersidad se define como la relación - $M_w / M_n$ -.

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

Las polidispersidades de peso molecular y las recuperaciones de todas las muestras se calcularon mediante el método de Debye usando un orden de ajuste polinomial de 1 en el programa informático Astra 4.72.

### Ejemplo 3 - ensayo clínico que compara la inmunización con Meningitec o un conjugado de MenC-TT de tamaño más grande

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

El estudio consistía en cinco grupos, cada uno planeado para contener 100 sujetos, asignados a dos grupos paralelos de la siguiente manera:

En este presente estudio, todos los sujetos en ambos grupos recibieron un quinta parte (1/5) de una dosis de Mencevax™ ACWY y una dosis concomitante de Infanrix™ hexa a los 12-15 meses de edad (mes de estudio 0). Se recogieron dos muestras de sangre de todos los sujetos (mes de estudio 0 y mes de estudio 1). El grupo 1 consistía en cuatro grupos de un estudio de vacunación primaria que se sensibilizaron a la edad de 3, 4 y 5 meses con las siguiente vacunas:



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

Los dos grupos de vacuna de Hib-MenC-TT (grupos L y M) se mantuvieron enmascarados en el estudio de refuerzo en cuando a la formulación exacta de la vacuna candidata.  
El grupo 2 (grupo O) consistía en sujetos de edad coincidente no vacunados previamente con una vacuna de serogrupo C de meningococo (nulivacunados), pero que habían recibido vacunas pediátricas habituales de acuerdo con la Comisión Permanente Alemana sobre Inmunización.

**15 Criterios de evaluación:**

*Immunogenicidad.* Determinación de títulos de anticuerpos bactericidas contra meningococo C (SBA-MenC) mediante un ensayo bactericida (punto de corte: una dilución de 1:8) y medición por ELISA de anticuerpos contra serogrupo C de meningococo (punto de corte del ensayo: 0,3 µg/ml), el polisacárido PRP de Hib (punto de corte del ensayo: 0,15 µg/ml) y toxoide tetánico (punto de corte del ensayo: 0,1 UI/ml) en muestras de sangre obtenidas antes de la vacunación y aproximadamente un mes después de la vacunación en todos los sujetos.

**Métodos estadísticos:**

*Demográfica:* Determinación de la edad media en meses (con la mediana, intervalo y desviación típica [DT]), y la composición racial y por géneros de la ATP y las cohortes vacunadas totales.

*Immunogenicidad:*

Se realizaron dos análisis de inmunogenicidad basados en la cohorte ATP para la inmunogenicidad (para análisis de memoria inmunitaria y respuesta de refuerzo) o la cohorte ATP para seguridad (para análisis de persistencia). Estos incluían: *Evaluación de la memoria inmunitaria para MenC y respuesta de refuerzo para Hib y tétanos* (antes y un mes después de la administración de 1/5 de la dosis de la vacuna de polisacárido puro):

- Determinación de la media geométrica de los títulos y concentraciones (GMT y GMC) con intervalos de confianza del 95 % (95 % CI)
- Determinación del porcentaje de sujetos con título/concentración de anticuerpo por encima de los puntos de corte propuestos con 95 % CI exacto (tasas de seropositividad/seroprotección)
- Investigación de títulos/concentración de anticuerpo después de vacunación usando curvas de acumulación inversas
- Cálculo de asíntota normalizada de 95 % CI para la diferencia en la tasa de seropositividad/seroprotección entre el grupo sensibilizado (grupos K, L, M y N) y el grupos no sensibilizado (grupo O)
- Determinación de la media geométrica de la relación individual del título de SBA-MenC sobre la concentración anti-PSC, con 95 % CI
- Determinación del 95 % CI para la relación de GMT/C después de la vacunación entre los grupos K, L, M y el grupo de control N para anti-PRP y antitetánica y entre cada grupo sensibilizado (grupos K, L, M y N) y el grupo no sensibilizado (grupo O) para SBA-MenC y anti-PSC usando un modelo de ANOVA

Resultados

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

Anticuerpo	Grupo	N	GMT/C	95 % CL LL	95 % CL UL
SBA-MenC	K -MenC-TT	71	3508,9	2580,1	4772,2
	L -HibMenC	79	2530,1	1831,7	3494,7

(continuación)

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

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

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

5

Tabla 2: Media geométrica de la relación para el título de SBA de MenC/concentración de anti-PSC

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

En los cuatro grupos sensibilizados (grupos K, L, M y N), la GMR aumentó significativamente desde antes de la vacunación de refuerzo hasta después de la misma, lo que indica la presencia de maduración y funcionalidad del anticuerpo. La GMR en el grupo M (sensibilizado con Hib5-MenC5-TT) fue mayor que en el grupo N (sensibilizado con Meningitec™).

10

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

Criterios de valoración	Grupo	N	%	Grupo	N	%	Diferencia	Valor de %
SBAMenC ≥ 1:8	K	79	88,6	N	91	80,2	N-K	-8,4
	L	84	93,3	N	91	80,2	N-L	-3,1
	M	85	87,1	N	91	80,2	N-M	-6,8
SBAMenC ≥ 1:128	K	79	65,8	N	91	51,6	N-K	-14,2
	L	84	56,0	N	91	51,6	N-L	-4,3
	M	85	64,7	N	91	51,6	N-M	-13,1
Anti-PSC ≥ 0,3 µg/ml	K	79	100,0	N	91	100,0	N-K	0,0
	L	84	100,0	N	91	100,0	N-L	0,0
	M	88	98,9	N	91	100,0	N-M	1,1
Anti-PSC ≥ 2 µg/ml	K	79	72,2	N	91	81,3	N-K	9,2
	L	84	64,3	N	91	81,3	N-L	17,0
	M	88	64,3	N	91	81,3	N-M	8,6
Anti-PRP ≥ 0,15 µg/ml	K	81	88,9	N	91	85,7	N-K	-3,2
	L	86	96,5	N	91	85,7	N-L	-10,8
	M	90	98,9	N	91	85,7	N-M	-13,2
Anti-PRP ≥ 1 µg/ml	K	81	33,3	N	91	28,6	N-K	-4,8
	L	86	55,8	N	91	28,6	N-L	-27,2
	M	90	74,4	N	91	28,6	N-M	-45,9

(continuación)

Criterios de valoración	Grupo	N	%	Grupo	N	%	Diferencia	Valor de %
Antitetánica ≥ 0,1 UI/ml	K	81	100,0	N	91	96,7	N-K	-3,3
	L	86	100,0	N	91	96,7	N-L	-3,3
	M	90	100,0	N	91	96,7	N-M	-3,3

Grupo K: sujetos sensibilizados con MenC10-TT + Infanrix™ hexa; Grupo L: sujetos sensibilizados con Hib10-MenC10-TT + Infanrix™ penta; Grupo M: sujetos sensibilizados con Hib5-MenC5-TT + Infanrix™ penta; Grupo N: sujetos sensibilizados con Meningitec™ + Infanrix™ hexa;  
N: número de sujetos con resultados disponibles

Se consiguieron títulos mayores de SBA contra MenC sensibilizando con el tamaño más grande de MenC (grupos K, L y M) en comparación con la sensibilización con el conjugado de oligosacárido MenC Meningitec.

5 **Memoria inmunitaria (cohorte ATP para inmunogenicidad)**

10 La administración de 1/5 de la dosis de la vacuna de polisacárido ACWY puro provocó un título muy alto de SBA-MenC en los cuatro grupos sensibilizados mostrando un 98,7-100 % y un 97,5-100 % de los sujetos sensibilizados con un régimen de vacuna candidata títulos de ≥ 1:8 y ≥ 1:128, respectivamente. En el grupos sensibilizado con el régimen de Meningitec™, hubo una tendencia a un porcentaje menor de sujetos con títulos de ≥ 1:128 (91,8 %). En comparación, un 17,6 % de los sujetos no sensibilizados tenían títulos de SBA de MenC ≥ 1:8 y ≥ 1:128.

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

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

- Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2,5/2,5/2,5: a partir de ahora mencionada como 2,5/2,5/2,5
- Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2,5/5/5: a partir de ahora mencionada como 2,5/5/5
- 20 • Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 5/5/5: a partir de ahora mencionada como 5/5/5
- Tritanrix™-HepB + Hiberix™: a partir de ahora mencionada como Hiberix
- Tritanrix.-HepB/Hiberix™ + Meningitec™: a partir de ahora mencionada como Meningitec Se recogieron muestras de sangre en el momento de la primera dosis de vacuna (antes) y un mes después de la tercera dosis de vacuna (después de la dosis 3).

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

Se usaron 105 sujetos en cada uno de los cinco grupos, dando un total de 525 sujetos en el estudio.

30 **Tabla 4 Contenido de formulaciones de vacuna de GSK**

Componentes por dosis (0,5 ml)	2,5/2,5/2,5*	2,5/5/5	5/5/5
Polisacárido capsular PRP de Hib conjugado con toxoide tetánico (TT)	2,5 µg	2,5 µg	5 µg
Polisacárido capsular de <i>Neisseria meningitidis</i> A (PSA) conjugado con TT	2,5 µg	5 µg	5 µg
Polisacárido capsular de <i>Neisseria meningitidis</i> C (PSC) conjugado con TT	2,5 µg	5 µg	5 µg

\* La vacuna 2,5/2,5/2,5 era una dilución de dosis de la vacuna de GSK Biologicals de Hib-MenAC 5/5/5 que contenía 25 µg de cada uno de PRP-TT, MenA-TT y MenC-TT.

35 Las formulaciones de vacuna de Hib-MenAC se mezclaron improvisadamente con Tritanrix-HepB. La vacuna combinada de GSK Biologicals contra la difteria-tétanos-*Bordetella pertussis* de células completas - hepatitis B (DTPw-HB) (Tritanrix-HepB) contiene no menos de 30 unidades internacionales (UI) de toxoide diftérico, no menos de 60 UI de toxoide tetánico, no menos de 4 UI de *Bordetella pertussis* inactivada y 10 µg de antígeno superficial de hepatitis B recombinante.

**Tratamiento de referencia, dosis, modo de administración, lote n.º:**

40 **Programa/sitio de vacunación:** Un grupo recibió vacuna Tritanrix™-HepB por vía intramuscular en el muslo izquierdo e Hiberix™ por vía intramuscular en el muslo derecho a las 6, 10 y 14 semanas de edad. Otro grupo recibió vacuna Tritanrix™-HepB/Hiberix™ por vía intramuscular en el muslo izquierdo y vacuna Meningitec. por vía intramuscular en el muslo derecho a las 6, 10 y 14 semanas de edad.

45 **Vacuna/composición/dosis/número de lote:** La vacuna Tritanrix™-HepB usada fue como se describe anteriormente.

Una dosis (0,5 ml) de vacuna de conjugado de *Haemophilus influenzae* de tipo b de GSK Biologicals: Hiberix™ contenía 10 µg de PRP conjugado con toxoide tetánico. En el grupo de Hiberix™, se mezcló con diluyente estéril y en el grupo de Meningitec™ se mezcló con Tritanrix™-HepB.

Una dosis (0,5 ml) de vacuna MENINGITEC™ de Wyeth Lederle contenía: 10 µg de oligosacárido capsular de grupo C de meningococo conjugado con 15 µg de proteína CRM197 de *Corynebacterium diphtheria* y aluminio como sales.

5 Resultados - respuestas inmunitarias generadas contra Hib, MenA y MenC

Tabla 5a Anti - PRP (µg/ml)

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

Tabla 5b SBA - MenC

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™					
	%	GMC/T	95 %CL LL	UL	GMC/T	95 %CL LL	UL	GMC/T	95 %CL LL	UL	%	GMC/T	95 %CL LL	UL	%	GMC/T	95 %CL LL	UL
% ≥1:8	99	99	94,7	100	100	96,5	100	100	96,5	100	2,9	2,9	0,6	8,4	100	100	96,5	100
GMT	3132	3132	2497	3930	4206	3409	5189	3697	3118	4384	4,7	4,7	3,9	5,6	4501	4501	3904	5180

Tabla 5c SBA MenA

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

Tabla 5d Anti-PSC (µg/ml)

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



Tabla 5e Anti - PSA (µg/ml)

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

Conclusión

Una comparación de los resultados de inmunogenicidad conseguidos usando la vacuna de conjugado de oligosacárido MenC-CRM197 y las tres formulaciones de GSK que contenían conjugados de polisacárido MenA-TT y MenC -TT mostró que los conjugados de polisacárido Men podían provocar una buena respuesta inmunógena similar a la conseguida usando la vacuna de conjugado de oligosacárido Meningitec. Todas las formulaciones ensayadas dieron una respuesta a MenC en el 100 % de los pacientes.

**Ejemplo 5 - Ensayo clínico en fase II que administra Hib MenCY de forma concomitante con Infanrix™ penta de acuerdo con un programa de 2, 3 y 4 meses**

**Diseño del estudio:** Un estudio en fase II, abierto (parcialmente con doble enmascaramiento\*) aleatorizado, controlado multicéntrico con 5 grupos que reciben un programa principal de tres dosis con las siguiente vacunas:

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

\*Hib-MenCY 2,5/5/5, Hib-MenCY 5/10/10 es Hib-MenC se administraron de una manera con doble enmascaramiento mientras que el grupo Hib-MenCY 5/5/5 y el grupo Menjugate™ estaban abiertos. Las formulaciones 2,5/5/5, 5/10/10 y 5/5/5 de Hib-MenCY contienen polisacáridos MenC nativos y polisacáridos MenY que están microfluidizados.

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

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

**Vacuna del estudio, dosis, modo de administración, número de lote:** Tres dosis inyectadas por vía intramuscular a intervalos de un mes, en aproximadamente los 2, 3 y 4 meses de edad de la siguiente manera:

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

Grupo	Programa (meses de edad)	Dosis de vacuna administrada Sitio-parte superior del muslo izquierdo	Vacuna concomitante administrada Sitio parte superior del muslo derecho
Hib-MenCY 2,5/5/5	2, 3 y 4	Hib (2,5 µg)-MenC-TT (5 µg)-MenY-TT (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenCY 5/10/10	2, 3 y 4	Hib (5 µg)-MenC-TT (1 µg)-MenY-TT (10 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenCY 5/5/5	2, 3 y 4	Hib (5 µg)-MenC-TT (5 µg)-MenY-TT (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenC	2, 3 y 4	Hib (5 µg)-MenC (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Menjugate™	2, 3 y 4	Menjugate™	DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix™ hexa)

**Inmunogenicidad:** Medición de títulos/concentraciones de anticuerpo contra cada antígeno de vacuna: Antes de la primera dosis (mes 0) y aproximadamente un mes después de la tercera dosis (mes 3) en todos los sujetos para: SBA-MenC y SBA-MenY, anti-PSC y anti-PSY, anti-PRP, anti-T, anti-FHA, anti-PRN y anti-PT. Usando la actividad bactericida en suero contra *N. meningitidis* serogrupos C e Y (punto de corte de SBA-MenC y SBA-MenY: 1:8 y 1:128); Ensayos ELISA con puntos de corte: ≥ 0,3 µg/ml y ≥2 µg/ml para antipolisacáridos de serogrupos C e Y de *N. meningitidis*(IgG anti-PSC e IgG anti-PSY); ≥ 0,15 µg/ml y ≥1,0 µg/ml para polisacárido polirribosil-ribitol-fosfato de Hib (IgG anti-PRP); 5 EL.U/ml para anti-FHA, anti-PRN, anti-PT; ≥ 0,1 UI/ml antitoxoide tetánico (anti-TT). Únicamente un mes después de la tercera dosis (mes 3) en todos los sujetos para: anti-D, anti-HB y antipolio 1, 2 y 3. Usando ensayos ELISA con puntos de corte: 0,1 UI/ml para antidiftérica (anti-D); ≥ 10 mUI/ml para antihepatitis B (anti-HB); y punto de corte de ensayo de microneutralización: 1:8 para antipolio de tipo 1, 2 y 3 (antipolio 1, 2 y 3).

**Métodos estadísticos:**

Se calcularon las tasas de seroprotección/seropositividad y las medias geométricas de las concentraciones/títulos (GMC/GMT) con intervalos de confianza del 95 % (95 % CI) por grupo, para SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY, anti-PRP, antitetánica, anti-PT, anti-FHA y anti-PRN antes de o un mes después de la vacunación; para antidiftérica, anti-HB, antipolio 1, antipolio 2 y antipolio 3 un mes después de la vacunación. La respuesta de la vacuna

(aparición de anticuerpos en sujetos inicialmente seronegativos o al menos mantenimiento de las concentraciones de anticuerpo en sujetos inicialmente seropositivos) con 95 % CI para anti-PT, anti-PRN y anti-FHA también se calcularon un mes después de la vacunación. También se presentan curvas de acumulación inversas para cada anticuerpo en el mes 3. Las diferencias entre los grupos Hib-MenCY e Hib-MenC, en comparación con el grupo de control de Menjugate™ se evaluaron de una manera exploratoria para cada anticuerpo, excepto para SBA-MenY y anti-PSY, en términos de (1) la diferencia entre el grupo Menjugate™ (menos) los grupos Hib-MenCY e Hib-MenC para el porcentaje de sujetos por encima de los puntos de corte especificados o con una respuesta de vacuna con su asíntota normalizada de 95 % CI, (2) las relaciones de GMC o GMT del grupo Menjugate™ sobre los grupos Hib-MenCY e Hib-MenC con su 95 % CI. Se hicieron las mismas comparaciones para evaluar la diferencia entre cada par de formulaciones de Hib-MenCY para anticuerpos anti-PRP, SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY y anti-TT.

Las incidencias globales de síntomas solicitados locales y generales se calcularon por grupo de acuerdo con el tipo de síntoma, su intensidad y relación con la vacunación (como porcentajes de sujetos que presentan síntomas generales, locales y cualquier síntomas solicitado en los 8 días después de la vacunación y su 95 % CI exacto). Se calcularon las incidencias de síntomas no solicitados por grupo. Para síntomas de grado 3, se proporcionaron aparición ≤ 48 horas, atención médica, duración, relación con la vacunación y resultados. Los eventos adversos graves se describieron completamente.

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

Tabla 7a Anti - PRP (µg/ml)

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

Tabla 7b SBA - MenC (título)

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

Tabla 7c Anti-PSC (µg/ml)

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

Tabla 7d SBA-MenY (título)

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

Tabla 7e Anti - PSY (µg/ml)

Grupo	N	% ≥ 0,3	LL	UL	≥ 2	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100,0	94,8	100,0	100,0	94,8	100,0	26,86	22,86	31,56
Hib MenCY 5/10/10	66	100,0	94,6	100,0	100,0	94,6	100,0	37,02	31,84	43,04
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	23,57	19,94	27,86

(continuación)

Grupo	N	% ≥ 0,3	LL	UL	≥ 2	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenC	74	8,1	3,0	16,8	4,1	0,8	11,4	0,19	0,15	0,25
Menjugate™	71	5,6	1,6	13,8	1,4	0,0	7,6	0,17	0,15	0,19

Tabla 7f Antitetánica (UI/ml)

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

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

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

GMC/T: media geométrica de la concentración/título 95 % CI = intervalo de confianza del 95 %; LL = límite inferior; UL = límite superior

Conclusión

5 Los conjugados de polisacárido MenC e Y producían una buena respuesta inmunitaria en todos los sujetos produciendo el 100 % de los sujetos respuestas por encima de 0,3 µg/ml contra MenC y MenY.

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

15 Este ejemplo presenta un estudio en fase II, abierto (parcialmente enmascarado), aleatorizado, controlado de intervalo de dosis para evaluar la inmunogenicidad de tres formulaciones diferentes de vacuna de conjugado de meningococos serogrupos A, C, W-135, Y con toxoide tetánico (MenACWY-TT) de GlaxoSmithKline Biological en comparación con una vacuna de conjugado de oligosacárido MenC-CRM197 (Meningitec™) cuando se da como una dosis a niños con edades de 12-14 meses.

20 El ensayo clínico era un estudio abierto (parcialmente con doble enmascaramiento\*), controlado, multicéntrico en que los sujetos elegible de 12-14 meses se asignaron aleatoriamente (1:1:1:1) a uno de cuatro grupos paralelos de 50 sujetos para que recibieran una única dosis primaria en la visita 1 de la siguiente manera:

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

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

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

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

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

35 *Programa/sitio de vacunación:* Se administró una única dosis de vacuna por vía intramuscular en el deltoides izquierdo en la visita 1 (mes del estudio 0) de acuerdo con la asignación aleatoria. Todas las vacunas candidatas se suministraron como un gránulo liofilizado en un vial monodosis (0,5 ml después de reconstitución con el diluyente salino suministrado).

40 *Inmunogenicidad.* Medición de títulos/concentraciones de anticuerpos contra componentes antigénicos de la vacuna contra meningococo en muestras de sangre obtenidas antes de la dosis de la vacuna del estudio (mes 0) y aproximadamente un mes después de la dosis de vacuna del estudio (mes 1) en todos los sujetos. Determinación de títulos de anticuerpo bactericida contra *N. meningitidis* serogrupos A, C, W-135 e Y (SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW y SBA-MenY) mediante un ensayo bactericida (puntos de corte del ensayo: una dilución de 1:8 y 1:128) y medición por ELISA de anticuerpos contra *N. meningitidis* serogrupos A, C, W-135 e Y (anti-PSA, anti-PSC, anti-PSW y anti-PSY, puntos de corte del ensayo ≥ 0,3 µg/ml y ≥ 2 µg/ml), y toxoide tetánico (antitetánica, punto de corte del ensayo 0,1 UI/ml).

45

Resultados

5 La respuesta de anticuerpo en términos del porcentaje de SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW y SBA-MenY que responden un mes después de la vacunación (el criterio de valoración principal) se muestra en la tabla 8. Una respuesta se define como más de o igual a un aumento de 4 veces para sujetos seropositivos o seroconversión para sujetos seronegativos antes de la vacunación.

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

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

10 La tabla 9 muestra los números de sujetos que consiguen títulos de SBA sobre los puntos de corte de 1:8 y 1:128, así como las GMT.

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

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

15 La vacunación con las tres formulaciones del conjugado de polisacárido de ACWY-TT dio lugar de buenas respuestas de SBA contra MenA, MenC, MenW y MenY con un 95-100 % de los sujetos con títulos mayores de 1:8. En particular, las formulaciones 5/5/5/5 y 2,5/10/2,5/2,5 de los conjugados de polisacárido producían una mayor respuesta contra MenC que la vacuna de oligosacárido Meningitec™, como se observa por una mayor proporción de sujetos que tienen un título mayor de 1:128 y las lecturas de GMT.

20

Tabla 10 Tasas de seropositividad y GMC para anticuerpos antipolisacárido un mes después de la vacunación

	Grupo	N	%	≥ 0,3 µg/ml LL	UL	%	≥ 2 µg/ml LL	UL	GMC µg/ml
Anti-MenA	Form. 1T	47	93,6	82,5	98,7	68,1	52,9	80,9	2,35

(continuación)

	Grupo	N	%	≥ 0,3 µg/ml LL	UL	%	≥ 2 µg/ml LL	UL	GMC µg/ml
	Form. 2T	45	100	92,1	100	64,4	48,8	78,1	3,11
	Form. 3T	48	95,8	85,7	99,5	37,5	24,0	52,6	1,65
	Meningitec™	50	10,0	3,3	21,8	2,0	0,1	10,6	0,18
Anti-MenC	Form. 1T	47	100	92,5	100	100	92,5	100	9,57
	Form. 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	12,53
	Form. 3T	47	100	92,5	100	97,9	88,7	99,9	19,29
	Meningitec™	49	98,0	89,1	99,9	93,9	83,1	98,7	7,95
Anti-MenW	Form. 1T	47	100	92,5	100	80,9	66,7	90,9	4,56
	Form. 2T	45	100	92,1	100	93,3	81,7	98,6	6,83
	Form. 3T	48	93,8	82,8	98,7	72,9	58,2	84,7	2,88
	Meningitec™	50	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0	7,1	0,15
Anti-MenY	Form. 1T	47	100	92,5	100	97,9	88,7	99,9	8,90
	Form. 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	12,78
	Form. 3T	47	97,9	88,7	99,9	87,2	74,3	95,2	5,67
	Meningitec™	50	2,0	0,1	10,6	0,0	0,0	7,1	0,15

Las tres formulaciones de la vacuna de conjugado de polisacárido de ACWY-TT produjeron buenas respuestas inmunitarias contra MenA, MenC, MenW y MenY consiguiendo entre un 93 % y un 100 % de los sujetos títulos mayores de 0,3 µg/ml. Se consiguieron lecturas mayores de GMC usando las formulaciones 5/5/5/5 y 2/5/10/2,5/2,5 de la vacuna de conjugado de polisacárido de ACWY-TT en comparación con Meningitec.

**Ejemplo 7 - comparación de inmunogenicidad de conjugados de polisacárido MenY nativo y con cambio de tamaño**

- 10 Ratones (DBA/2 hembra de 6-8 semanas) recibieron dos inyecciones, separadas 2 semanas, de PSY-TT por vía subcutánea. Se tomaron muestras de sangre 14 días después de la segunda inyección para realizar ELISA y SBA anti-PSY usando la cepa S1975 de menY. Por inyección, los ratones recibieron 1 µg de PSY-TT(formulación lio. no ads.).
- 15 Se usaron los conjugados descritos en la tabla 11.

Tabla 11

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

Resultados

Los resultados (figura 1) muestran una tendencia hacia mayor inmunogenicidad para conjugados preparados usando PSY cambiado de tamaño. La figura 1A muestra los resultados de GMC obtenidos en un ELISA para anticuerpo generado contra conjugados preparados a partir de MenY nativo (ENYTT012), MenY microfluidizado - 40 ciclos (ENYTT014) y MenY microfluidizado - 20 ciclos (ENYTT015 bis). Se obtuvieron GMC mayores cuando MenY-TT se preparaba a partir de MenY microfluidizado.

Se obtuvieron resultados similares cuando el antisero se evaluaba por ensayo de SBA (figura 1B). De nuevo, los valores de GMT mayores se consiguieron usando conjugados preparados a partir de MenY microfluidizado.

**Ejemplo 8 - Ensayo clínico que evalúa el efecto de un conector en MenA en una vacuna de conjugado de MenACWY**

Se administró una única dosis de diferentes formulaciones de vacuna de MenACWY a adolescentes de 15-19 años en 5 grupos de 25 sujetos en un ensayo aleatorizado 1:1:1:1:1. Las formulaciones ensayadas fueron:

- F1 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico, conteniendo el conjugado de MenA un espaciador AH - 5/5/5/5 µg
- F2 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico, conteniendo el conjugado de MenA un espaciador AH - 2,5/5/2,5/2,5 µg
- F3 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico, conteniendo el conjugado de MenA un espaciador AH - 5/5/2,5/2,5 µg
- F4 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico sin espaciador en ningún conjugado - 5/5/5/5 µg Grupo de control - Mencevax ACWY

En el día 30 después de la inoculación, se tomó una muestra de sangre de los pacientes.

Las muestras de sangre se usaron para evaluar el porcentaje de SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW135 y SBA-MenY que responden un mes después de la dosis de vacuna. Una respuesta de la vacuna se definió como 1) para sujetos inicialmente seronegativos, un título de anticuerpo después de la vacunación  $\geq 1/32$  en 1 mes o 2) para sujetos inicialmente seropositivos, título de anticuerpo de  $\geq 4$  veces el título de anticuerpo antes de la vacunación.

Resultados

Como se muestra en la tabla 13, el uso de un espaciador en el conjugado de MenA dio lugar a una respuesta inmunitaria aumentada contra MenA. El porcentaje de los que responden aumentó desde un 66 % hasta un 90-95 % cuando se añadía el espaciador AH. Esto se reflejó en un aumento en GMT de SBA de 4335 a 10 000 y un aumento en GMC de 5 a 20-40. Sorprendentemente, el uso de un espaciador AH también dio lugar a una respuesta inmunitaria aumentada contra MenC, como se observa por un aumento en el porcentaje de los que responden y un aumento en GMT de SBA. También pudo observarse un aumento en GMT de SBA contra MenY (6742-7122) y contra MenW (4621-5418) cuando se introducía un espaciador.

Tabla 12

Formulación	% de los que responden a SBA MenA	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC µg/ml ELISA
F1 5AH/5/5/5	90,9	9805	20,38
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	75	8517	29,5
F3 5AH/5/2,5/2,5	95,5	10290	47,83
F4 5/5/5/5	66,7	4335	5,46
Mencevax™	85,7	8022	27,39
Formulación	% de los que responden a SBA MenC	SBA-MenC GMT	Anti-PSC GMC µg/ml ELISA
F1 5AH/5/5/5	69,6	3989	12,11
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	81,8	3524	12,78
F3 5AH/5/2,5/2,5	81,8	3608	8,4
F4 5/5/5/5	73,9	2391	8,84
Mencevax™	90,0	5447	38,71
Formulación	% de los que responden a SBA MenW	SBA-MenW GMT	Anti-PSW GMC µg/ml ELISA
F1 5AH/5/5/5	95	5418	9,65
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	85	4469	14,55
F3 5AH/5/2,5/2,5	95,5	4257	6,39
F4 5/5/5/5	95,5	4621	10,7
Mencevax™	86,4	2714	13,57
Formulación	% de los que responden a SBY MenY	SBA-MenY GMT	Anti-PSY GMC µg/ml ELISA
F1 5AH/5/5/5	91,3	7122	16,3
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	87,5	5755	12,52
F3 5AH/5/2,5/2,5	80	5928	8,88
F4 5/5/5/5	91,3	6742	13,88
Mencevax™	91,7	4854	21,02

**Ejemplo 9 - Ensayo clínico que evalúa el efecto de un conector en conjugados de MenA y MenC en una vacuna de conjugado de MenACWY**

Se administró una única dosis de diferentes formulaciones de vacuna de MenACWY a adolescentes de 15-19 años en 5 grupos de 25 sujetos en un ensayo aleatorizado 1:1:1:1:1. Las formulaciones ensayadas fueron:

- F1 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico, conteniendo los conjugados de MenA y MenC un espaciador AH - 2,5/2,5/2,5/2,5 µg
- F2 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico, conteniendo los conjugados de MenA y MenC un espaciador AH - 5/5/2,5/2,5 µg
- F3 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico, conteniendo los conjugados de MenA y MenC un espaciador AH

## ES 2 747 025 T3

- 5/5/5/5 µg

F4 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico, conteniendo el conjugado de MenA un espaciador AH - 5/5/5/5 µg  
Grupo de control - Mencevax ACWY

5 En el día 30 después de la inoculación, se tomó una muestra de sangre de los pacientes.

Las muestras de sangre se usaron para evaluar el porcentaje de SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW135 y SBA-MenY que responden un mes después de la dosis de vacuna. Una respuesta de la vacuna se definió como 1) para sujetos inicialmente seronegativos, un título de anticuerpo después de la vacunación  $\geq 1/32$  en 1 mes o 2) para sujetos inicialmente seropositivos, título de anticuerpo de  $\geq 4$  veces el título de anticuerpo antes de la vacunación.

10

### Resultados

15

La introducción de un espaciador AH en el conjugado de MenC dio lugar a un aumento en la respuesta inmunitaria contra MenC como se muestra en la tabla 14. Esto se demuestra por un aumento en GMT de SBA de 1943 a 4329 y un aumento en GMC anti-PSC de 7,65 a 13,13. Se mantuvieron buenas respuestas inmunitarias contra MenA, MenW y MenY.

Tabla 13

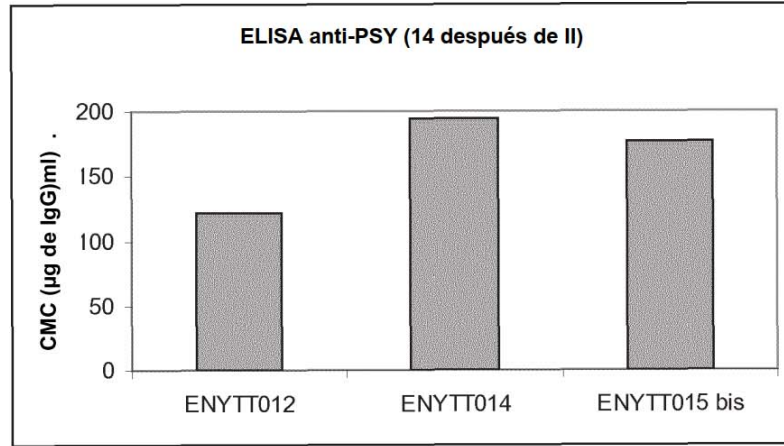
Formulación	% de los que responden a SBA MenA	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC µg/ml ELISA
F1 <sub>2,5AH/2,5AH/2,5/2,5</sub>	75	8417	20,23
F2 <sub>5AH/5AH/2,5/2,5</sub>	72	6299	16,07
F3 <sub>5AH/5AH/5/5</sub>	87	9264	27,26
F4 <sub>5AH/5/5/5</sub>	77,3	9632	20,39
Mencevax™	78,3	8284	12,93
Formulación	% de los que responden a SBA MenC	SBA-MenC GMT	Anti-PSC GMC µg/ml ELISA
F1 <sub>2,5AH/2,5AH/2,5/2,5</sub>	88	3619	12,82
F2 <sub>5AH/5AH/2,5/2,5</sub>	88	2833	13,32
F3 <sub>5AH/5AH/5/5</sub>	95,8	4329	13,13
F4 <sub>5AH/5/5/5</sub>	95,8	1943	7,65
Mencevax™	91,7	1567	16,55
Formulación	% de los que responden a SBA MenW	SBA-MenW GMT	Anti-PSW GMC µg/ml ELISA
F1 <sub>2,5AH/2,5AH/2,5/2,5</sub>	100	5656	7
F2 <sub>5AH/5AH/2,5/2,5</sub>	96	4679	5,4
F3 <sub>5AH/5AH/5/5</sub>	91,3	4422	4,45
F4 <sub>5AH/5/5/5</sub>	88	4947	7,67
Mencevax™	96	3486	11,93
Formulación	% de los que responden a SBY MenY	SBA-MenY GMT	Anti-PSY GMC µg/ml ELISA
F1 <sub>2,5AH/2,5AH/2,5/2,5</sub>	75	3891	17,81
F2 <sub>5AH/5AH/2,5/2,5</sub>	92	3968	11,96
F3 <sub>5AH/5AH/5/5</sub>	79,2	2756	9,51
F4 <sub>5AH/5/5/5</sub>	80	3914	16,76
Mencevax™	88	3056	21,41



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunógena que comprende sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis* (MenA), sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC), sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis* (MenY) y sacárido capsular del serogrupo W de *N. meningitidis* (MenW) conjugados por separado con el mismo tipo de proteína de vehículo, en la que:
- 10 (a) MenA o MenA y MenC se conjugan con la proteína de vehículo mediante un grupo carboxilo en el vehículo proteínico y un conector de dihidrazida de ácido adípico (ADH), en la que el sacárido capsular o cada sacárido capsular conjugado mediante el conector ADH se conjuga con el conector con química de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) y la proteína de vehículo se conjuga con el conector ADH con química de 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida (EDAC), en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 1:2-1:5;
- 15 (b) los sacáridos de *N. meningitidis* de MenC, MenY y MenW distintos de (a), se conjugan con la proteína de vehículo mediante un grupo amino en el vehículo proteínico, en la que la relación de sacárido:proteína (p/p) es entre 5:1-1:1,99; y
- (c) la proteína de vehículo es TT.
- 20 2. Una composición inmunógena de la reivindicación 1, en la que el primer y el segundo tipo de grupo químico en el vehículo proteínico están presentes en epítomos de linfocitos B y/o T distintos en la proteína de vehículo.
3. La composición inmunógena de la reivindicación 1 o 2, en la que la relación de sacárido MenW a la proteína de vehículo es entre 5:1-1:1,99, 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,8, 1:1-1:1,7, 1:1,2-1:1,6 o 1:1,4-1:1,5 (p/p).
- 25 4. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la relación de sacárido MenY a la proteína de vehículo es entre 5:1-1:1,99, 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,9, 1:1-1:1,8, 1:1,1-1:1,6 o 1:1,3-1:1,4 (p/p).
5. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la relación de sacárido MenA a la proteína de vehículo es entre 1:2-1:5, 1:2,4-1:4, 1:2,7-1:3,5 o 1:2,9-1:3,1 (p/p).
- 30 6. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la relación de sacárido MenC a la proteína de vehículo es entre 5:1-1:1,99, 2:1-1:1,99, 1,5:1-1:1,8, 1,3:1-1:1,6, 1,2:1-1:1,4 o 1,1:1-1:1,2 (p/p).
7. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la relación de sacárido MenC a la proteína de vehículo es entre 1:2-1:5, 1:2,5-1:4,5, 1:2,7-1:4,3, 1:3-1:4 o 1:3,3-1:3,5 (p/p).
- 35 8. Una vacuna que comprende la composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Un proceso para generar la vacuna de la reivindicación 8, que comprende la etapa de mezclar la composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40 10. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedad causada por infección por *Neisseria meningitidis*.

A



B

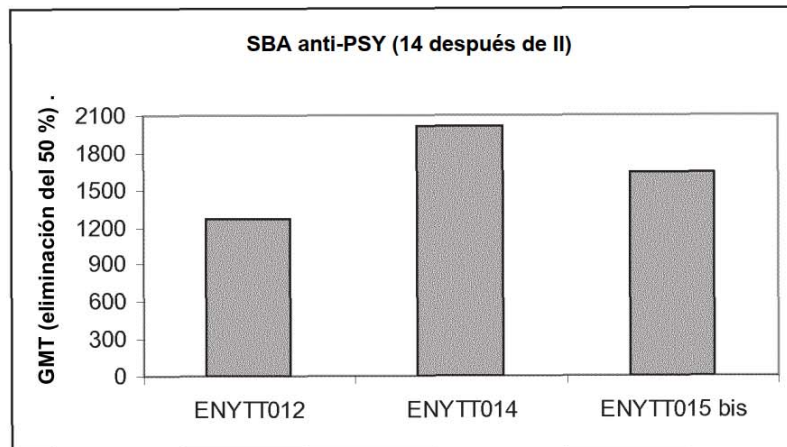


Figura 1