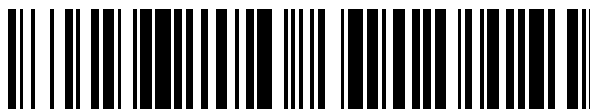


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 651**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2006** **E 10158046 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018** **EP 2201961**

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 0526040

21.12.2005 GB 0526041

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2018

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)

Rue de l'Institut, 89

1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

BIEMANS, RALPH LEON;

POOLMAN, JAN;

DUVIVIER, PIERRE;

DENOEL, PHILIPPE;

CAPIAU, CARINE y

BOUTRIAU, DOMINIQUE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 662 651 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

La presente solicitud se refiere a composiciones inmunógenas y vacunas que comprenden un conjugado de sacárido Hib y al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos, a procedimientos para la preparación de esas composiciones inmunógenas y vacunas, y a usos y procedimientos de inmunización usando la composición inmunógena y la vacuna.

Los polisacáridos bacterianos han demostrado ser inmunógenos eficaces para su uso en vacunas, particularmente cuando están conjugados con una proteína portadora. Hay vacunas de conjugados comerciales disponibles contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hibiter® Wyeth-Lederle), polisacáridos de neumococo (Prevnar® -Wyeth-Lederle) y polisacáridos de meningococo (Meningitec® - Wyeth-Lederle y Menactra® - Sanofi).

También se han descrito composiciones inmunógenas y vacunas que comprenden un conjugado Hib y conjugados de sacáridos bacterianos adicionales. Por ejemplo, el documento WO 02/00249 describe composiciones inmunógenas que comprenden un conjugado PRP Hib y conjugados de polisacáridos u oligosacáridos adicionales en los que los conjugados de polisacáridos no se adsorben sobre el adyuvante, particularmente sales de aluminio. Los resultados de ensayos clínicos presentados usan las mismas dosis de todos los polisacáridos bacterianos.

Choo y col. en *Pediatr. Infect. Dis. J.* (2000) 19; 854-62 describe la inoculación de niños pequeños con una vacuna de conjugado de neumococo 7-valente mezclada con una vacuna de conjugado de *Haemophilus influenzae* tipo b (hib) conocida como HbOC. La dosis de conjugado hib administrado fue 5 veces superior que la dosis de cada uno de los conjugados del polisacárido de neumococo administrados.

La presente invención se refiere a la proporción de una combinación de vacuna que comprende un conjugado Hib y conjugados de sacáridos bacterianos adicionales que es capaz de desencadenar una respuesta inmunógena mejorada debido a la optimización de la dosis del conjugado Hib y de otros conjugados de polisacáridos bacterianos.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención proporciona una composición inmunógena que comprende un conjugado de sacárido Hib y al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos en los que el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido inferior que la dosis de sacárido media de los al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos.

Descripción detallada

La composición inmunógena de la invención comprende un conjugado de sacárido Hib y al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos en la que el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido inferior que está entre el 20 % y el 60 % de la dosis de sacárido media de los al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos en la que los al menos dos conjugados de sacáridos bacterianos comprenden sacáridos capsulares de *N. meningitidis* derivados de cepas seleccionadas del grupo que consiste en los serogrupos A, C, W135 e Y. Alternativamente, el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido inferior que la dosis de sacárido de cada uno de los al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos. La divulgación revela por ejemplo, la dosis del conjugado Hib puede ser al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 % inferior que la media o que la dosis de sacárido más baja de los al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos.

El término "sacárido" incluye polisacáridos u oligosacáridos. Los polisacáridos se aíslan a partir de bacterias o se aíslan a partir de bacterias y se clasifican por tamaños en algún grado mediante procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, documentos EP497524 y EP497525) y opcionalmente por microfluidización. Los polisacáridos se pueden clasificar por tamaños para reducir la viscosidad en las muestras de polisacáridos y/o mejorar la filtrabilidad de los productos conjugados. Los oligosacáridos tienen una serie de unidades de repetición (normalmente 5-30 unidades de repetición) y normalmente son polisacáridos hidrolizados.

La "dosis media" se determina sumando las dosis de todos los polisacáridos adicionales y dividiendo por el número de polisacáridos adicionales. La "dosis" es la cantidad de composición inmunógena o vacuna que se administra a un ser humano.

Los polisacáridos opcionalmente se clasifican por tamaños hasta 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 veces del tamaño del polisacárido aislado a partir de la bacteria.

"Clasificado por tamaño por un factor de hasta x2" significa que el polisacárido se somete a un procedimiento previsto para reducir el tamaño del polisacárido, pero para retener un tamaño superior a la mitad del tamaño del polisacárido nativo. X3, x4, etc. se deben interpretar de la misma forma, es decir, el polisacárido se somete a un procedimiento previsto para reducir el tamaño del polisacárido, pero para retener un tamaño superior a un tercio, un cuarto, etc., del tamaño del polisacárido nativo, respectivamente.

El tamaño del sacárido MenA es de, por ejemplo, 5-200 kDa, 10-20 kDa, 5-10 kDa, 20-30 kDa, 20-40 kDa, 40-80 kDa, 60-80 kDa, 60-70 kDa o 70-80 kDa.

El tamaño del sacárido MenC es de, por ejemplo, 5-200 kDa, 10-20 kDa, 5-10 kDa, 5-15 kDa, 20-50 kDa, 50-100 kDa, 100-150 kDa, 150-210 kDa.

El tamaño del sacárido MenW es de, por ejemplo, 5-200 kDa, 10-20 kDa, 5-10 kDa, 20-50 kDa, 50-100 kDa, 100-150 kDa o 120-140 kDa.

- 5 El tamaño del sacárido MenY es de, por ejemplo, 5-200 kDa, 10-20 kDa, 5-10 kDa, 20-50 kDa, 50-100 kDa, 100-140 kDa, 140-170 kDa o 150-160 kDa como se determina mediante MALLS.

En una forma de realización, la polidispersidad de los sacáridos es de 1-1,5, 1-1,3, 1-1,2, 1-1,1 o 1-1,05 y después de la conjugación a una proteína portadora, la polidispersidad del conjugado es de 1,0-2,0, 1,0-1,5, 1,0-1,2 o 1,5-2,0. Todas las medidas de polidispersidad se realizan por MALLS.

- 10 Para los análisis por MALLS de sacáridos de meningococo, se pueden usar 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 célula P100 y un filtro rojo a 498 nm).

- 15 Un sacárido Hib es el polisacárido u oligosacárido capsular de polirribosil fosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b.

- "Al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos" se refiere a al menos dos conjugados de sacáridos en los que los sacáridos son diferentes de Hib y entre sí. Los al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos pueden derivar de uno o más de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, Estreptococos del Grupo A, Estreptococos del Grupo B, *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*. En una forma de realización, la composición inmunógena comprende polisacáridos u oligosacáridos capsulares derivados de uno o más de los serogrupos A, B, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*. Una forma de realización adicional comprende polisacáridos u oligosacáridos capsulares derivados de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos del polisacárido u oligosacárido capsular de neumococo opcionalmente se seleccionan entre 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 (por ejemplo entre los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). Una forma de realización adicional comprende los polisacáridos u oligosacáridos capsulares de Tipo 5, Tipo 8 o 336 de *Staphylococcus aureus*. Una forma de realización adicional comprende los polisacáridos capsulares de Tipo I, Tipo II o Tipo III de *Staphylococcus epidermidis*. Una forma de realización adicional comprende el sacárido Vi (poli u oligosacárido) de *S. typhi*. Una forma de realización adicional comprende los polisacáridos u oligosacáridos capsulares de Tipo Ia, Tipo Ic, Tipo II o Tipo III de estreptococos del Grupo B. Una forma de realización adicional comprende los polisacáridos u oligosacáridos capsulares de estreptococos del Grupo A, opcionalmente que comprende además al menos una proteína M o múltiples tipos de proteína M. En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende adicionalmente un antígeno del serogrupo B de *N. meningitidis*. El antígeno opcionalmente es un polisacárido capsular del serogrupo B de *N. meningitidis* (MenB) o un polisacárido u oligosacárido clasificado por tamaño derivado de él. El antígeno opcionalmente es una preparación de vesícula de la membrana externa del serogrupo B de *N. meningitidis* como se describe en los documentos EP301992, WO 01/09350, WO 04/14417, WO 04/14418 y WO 04/14419.

- En una forma de realización, los al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos comprenden opcionalmente el sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC), los sacáridos capsulares del serogrupo C e Y (MenCY), los sacáridos capsulares del serogrupo C y A (MenAC), los sacáridos capsulares del serogrupo C y W (MenCW), el sacárido capsular del serogrupo A e Y (MenAY), los sacáridos capsulares del serogrupo A y W (MenAW), los sacáridos capsulares del serogrupo W e Y (Men WY), el sacárido capsular del serogrupo A, C y W (MenACW), los sacáridos capsulares del serogrupo A, C e Y (MenACY); los sacáridos capsulares del serogrupo A, W135 e Y (MenAWY), los sacáridos capsulares del serogrupo C, W135 e Y (MenCWY); o los sacáridos capsulares del serogrupo A, C, W135 e Y (MenACWY), los sacáridos capsulares del serogrupo B y C (MenBC), los sacáridos capsulares del serogrupo B, C e Y (MenBCY), los sacáridos capsulares del serogrupo B, C y A (MenABC), los sacáridos capsulares del serogrupo B, C y W (MenBCW), el sacárido capsular del serogrupo A, B e Y (MenABY), los sacáridos capsulares del serogrupo A, B y W (MenABW), los sacáridos capsulares del serogrupo B, W e Y (MenBWY), el sacárido capsular del serogrupo A, B, C y W (MenABCW), los sacáridos capsulares del serogrupo A, B, C e Y (MenABCY); los sacáridos capsulares del serogrupo A, B, W135 e Y (MenABWY), los sacáridos capsulares del serogrupo B, C, W135 e Y (MenBCWY); o los sacáridos capsulares del serogrupo A, B, C, W135 e Y (MenABCWY).

- La composición inmunógena de la invención opcionalmente contiene el conjugado de sacárido Hib en una dosis de sacárido entre 0,1 y 9 µg; 1 y 5 µg o 2 y 3 µg o en torno o exactamente a 2,5 µg y cada uno de los al menos otros dos conjugados de sacáridos a una dosis de entre 2 y 20 µg, 3 y 10 µg, o entre 4 y 7 µg o en torno o exactamente a 5 µg.

"En torno" o "aproximadamente" para los propósitos de la invención se definen como dentro del 10 % superior o inferior de la cifra dada.

La composición inmunógena de la divulgación contiene una dosis de sacárido del conjugado de sacárido Hib que es, por ejemplo, inferior al 90 %, 80 %, 75 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o 10 % de la dosis de sacárido media de los al menos otros dos conjugados de sacárido. La dosis de sacárido del sacárido Hib está, por ejemplo, entre el 20 % y el 60 %, el 30 % y el 60 %, el 40 % y el 60 %, o en torno o exactamente al 50 % de la dosis de sacárido media de los al menos otros dos conjugados de sacárido.

La composición inmunógena de la divulgación contiene una dosis de sacárido del conjugado de sacárido Hib que es, por ejemplo, inferior al 90 %, 80 %, 75 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o 10 % de la dosis de sacárido más baja de los al menos otros dos conjugados de sacárido. La dosis de sacárido del sacárido Hib está, por ejemplo, entre el 20 % y el 60 %, el 30 % y el 60 %, el 40 % y el 60 %, o en torno o exactamente al 50 % de la dosis de sacárido más baja de los al menos otros dos conjugados de sacárido.

En una forma de realización de la invención, la dosis de cada uno de los dos o más sacáridos adicionales es opcionalmente la misma, o aproximadamente la misma.

Ejemplos de composiciones inmunógenas de la invención son composiciones que constan de o comprenden:

conjugado Hib y conjugado MenA y conjugado MenC, opcionalmente a relaciones de dosis de sacárido de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacárido de MenA es superior que la dosis de sacárido de MenC.

conjugado Hib y conjugado MenC y conjugado MenY, opcionalmente a relaciones de dosis de sacárido de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacárido de MenC es superior que la dosis de sacárido de MenY.

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

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

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

conjugado Hib y conjugado MenW y conjugado MenY, opcionalmente a relaciones de dosis de sacárido de 1:2:2, 1:2:1, 1:1:2, 1:4:2, 1:2:4, 1:4:1, 1:1:4, 1:3:6, 1:1:3, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente la dosis de sacárido de MenY es superior que la dosis de sacárido de MenW.

Hib y los al menos otros dos sacáridos incluidos en las composiciones farmacéuticas de la invención están conjugados a una proteína portadora tal como el toxoide del tétano, el fragmento C del toxoide del tétano, mutantes no tóxicos del toxoide del tétano, el toxoide de la difteria, CRM197, otros mutantes no tóxicos de la toxina de la difteria [tales como CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida y col. J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; delecciones o mutaciones de la Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones descritas en el documento US 4709017 o US 4950740; la mutación de al menos uno o más residuos de Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones descritas en el documento US 5917017 o US 6455673; o un fragmento descrito en el documento US 5843711], la neumolisina de neumococo, la OMPC (proteína de la membrana externa de meningococo - normalmente extraída del serogrupo B de *N. meningitidis* - documento EP0372501), péptidos sintéticos (documentos EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas de *pertussis* (documentos WO 98/58668, EP0471177), citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células T CD4+ humanas procedentes de antígenos derivados de diversos patógenos (Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) tales como la proteína N19 (Baraldoi y col. (2004) Infect Immun 72; 4884-7), la proteína superficial de neumococo PspA (documento WO 02/091998), neumolisina (Kuo y col. (1995) Infect Immun 63; 2706-13), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761) o la proteína D (documento US6342224).

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención usa la misma proteína portadora (seleccionada independientemente) en el conjugado Hib y en los al menos otros dos conjugados del sacárido bacteriano, opcionalmente en el conjugado Hib y en cada uno de los al menos otros dos conjugados del sacárido bacteriano (por ejemplo, todos los otros conjugados del sacárido presentes en la composición inmunógena).

En una forma de realización, la composición inmunógena comprende opcionalmente un conjugado de sacárido Hib y un conjugado del polisacárido MenA, un conjugado de sacárido Hib y un conjugado del polisacárido MenC, un conjugado de sacárido Hib y un conjugado del polisacárido MenW, un conjugado de sacárido Hib y un conjugado del polisacárido MenY, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de los polisacáridos MenA y MenC, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de los polisacáridos MenA y MenW, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de los polisacáridos MenA y MenY, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de los polisacáridos MenC y MenW, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de los polisacáridos MenC y MenY, un conjugado de sacárido Hib y

conjugados de los polisacáridos MenW y MenY, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de los polisacáridos MenA, MenC y MenW, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de los polisacáridos MenA, MenC y MenY, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de los polisacáridos MenA, MenW y MenY, un conjugado de sacárido Hib y conjugados de los polisacáridos MenC, MenW y MenY o un conjugado de sacárido Hib y conjugados de los polisacáridos MenA, MenC, MenW y MenY.

En una forma de realización, una sola proteína portadora puede llevar más de un antígeno sacarídico (documento WO 04/083251). Por ejemplo, una sola proteína portadora podría estar conjugada a Hib y MenA, Hib y MenC, Hib y MenW, Hib y MenY, MenA y MenC, MenA y MenW, MenA y MenY, MenC y MenW, MenC y MenY o Men W y MenY.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende un sacárido Hib conjugado a una proteína portadora seleccionado del grupo constituido por TT, DT, CRM197, fragmento C del TT y proteína D.

Cuando la proteína portadora es TT o uno de sus fragmentos para Hib y los al menos otros dos sacáridos, la dosis total de portador está entre 2,5-25 µg, 3-20 µg, 4-15 µg, 5-12,5 µg, 15-20 µg, 16-19 µg o 17-18 µg.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos otros dos sacáridos bacterianos conjugados a una proteína portadora seleccionada del grupo constituido por TT, DT, CRM197, fragmento C del TT y proteína D.

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

La composición inmunógena de la divulgación comprende opcionalmente al menos un conjugado de sacárido de meningococo (por ejemplo MenA y/o MenC y/o MenW y/o MenY) que tiene una relación de sacárido Men a proteína portadora de entre 1:5 y 5:1, entre 1:2 y 5:1, entre 1:0,5 y 1:2,5 o entre 1:1,25 y 1:2,5 (p/p).

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

En una forma de realización, el sacárido Hib de la composición inmunógena de la invención está conjugado a la proteína portadora a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador bifuncional. El enlazador opcionalmente es heterobifuncional u homobifuncional, que tiene por ejemplo un grupo amino reactivo y un grupo ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amino reactivos o dos grupos ácido carboxílico reactivos. El enlazador tiene por ejemplo entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un posible enlazador es ADH. Otros enlazadores incluyen B-propionamido (documento WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gevers y col. (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), haluros de haloalquilo (documento US4057685), enlaces glicosídicos (documentos US4673574, US4808700) y ácido 6-aminocaproico (documento US4459286).

Los conjugados de sacáridos presentes en las composiciones inmunógenas de la invención se pueden preparar mediante cualquier técnica de acoplamiento conocida. Por ejemplo, el sacárido se puede acoplar a través de un enlace tioéter. El procedimiento de conjugación puede depender de la activación del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. Así el sacárido activado se puede acoplar directamente o a través de un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino sobre la proteína portadora. Opcionalmente, el éster de cianato se acopla con hexanodiamina o ADH y el sacárido derivado con un grupo amino se conjuga a la proteína portadora usando la química de heterologación que supone la formación del enlace tioéter, o se conjuga a la proteína portadora usando química de la carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC). Esos conjugados se describen en la solicitud PCT publicada WO 93/15760 de la Universidad de servicios uniformados y en los documentos WO 95/08348 y WO 96/29094.

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

Los conjugados también se pueden preparar mediante procedimientos de aminación reductora directa como se describe en los documentos US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). Se describen otros procedimientos en los documentos EP-0-161188, EP-208375 y EP-0-477508.

Un procedimiento adicional supone el acoplamiento de un sacárido activado con bromuro de cianógeno (o CDAP) y derivado con hidrazida del ácido adípico (ADH) a la proteína portadora por condensación con carbodiimida (Chu C. y col. Infect. Immunity, 1983 245 256), por ejemplo, usando EDAC.

En una forma de realización, un grupo hidroxilo sobre un sacárido está directa o indirectamente (a través de un enlazador) unido a un grupo amino o carboxílico sobre una proteína. Cuando el enlazador está presente, un grupo hidroxilo está opcionalmente unido sobre un sacárido a un grupo amino sobre un enlazador, por ejemplo, usando la conjugación con CDAP. Se puede conjugar un grupo amino adicional en el enlazador (por ejemplo, ADH) a un grupo ácido carboxílico sobre una proteína, por ejemplo, usando la química de la carbodiimida, por ejemplo, usando EDAC. En una forma de realización, el Hib o al menos otros dos sacáridos se conjuga primero al enlazador antes de que el enlazador se conjuga a la proteína portadora.

En una forma de realización, el sacárido Hib se conjuga a la proteína portadora usando CNBr, o CDAP, o una combinación de CDAP y la química de la carbodiimida (tal como EDAC), o una combinación de CNBr y la química de la carbodiimida, (tal como EDAC). Opcionalmente, Hib se conjuga usando CNBr y la química de la carbodiimida (tal como EDAC). Por ejemplo, el CNBr se usa para unir el sacárido y el enlazador y a continuación se usa la química de la carbodiimida para unir el enlazador a la proteína portadora.

En una forma de realización, al menos uno de los al menos otros dos sacáridos está directamente conjugado a una proteína portadora, opcionalmente el sacárido(s) Men W y/o MenY y/o MenC está directamente conjugado a una proteína portadora. Por ejemplo, MenW; MenY; MenC; MenW y MenY; MenW y MenC; MenY y MenC; o MenW, MenY y MenC están directamente unidos a la proteína portadora. Opcionalmente, al menos uno de los al menos otros dos sacáridos está directamente conjugado por CDAP. Por ejemplo, MenW; MenY; MenC; MenW y MenY; MenW y MenC; MenY y MenC; o MenW, MenY y MenC están directamente unidos a la proteína portadora por CDAP (véanse los documentos WO 95/08348 y WO 96/29094).

En una forma de realización, la relación de sacárido Men W y/o Y a proteína portadora está entre 1:0,5 y 1:2 (p/p) o la relación de sacárido MenC a proteína portadora está entre 1:0,5 y 1:2 o 1:1,25 y 1:1,5 o 1:0,5 y 1:1 (p/p), especialmente cuando estos sacáridos están directamente unidos a la proteína, opcionalmente usando CDAP.

En una forma de realización, al menos uno de los al menos otros dos sacáridos se conjuga a la proteína portadora a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador bifuncional. El enlazador es opcionalmente heterobifuncional u homobifuncional, que tiene por ejemplo un grupo amino reactivo y un grupo ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amino reactivos o dos grupos ácido carboxílico reactivos. El enlazador tiene, por ejemplo, entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un posible enlazador es ADH.

En una forma de realización, MenA; MenC; o MenA y MenC está conjugado a una proteína portadora a través de un enlazador.

En una forma de realización, el sacárido adicional está conjugado a una proteína portadora a través de un enlazador usando CDAP y EDAC. Por ejemplo, MenA; MenC; o MenA y MenC están conjugados a una proteína a través de un enlazador (por ejemplo, aquellos con dos grupos amino en sus extremos tales como ADH) usando CDAP y EDAC como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el CDAP se usa para conjugar el sacárido a un enlazador y el EDAC se usa para conjugar el enlazador a una proteína. Opcionalmente, la conjugación a través de un enlazador resulta en una relación de sacárido a proteína portadora de entre 1:0,5 y 1:6; 1:1 y 1:5 o 1:2 y 1:4, para MenA; MenC; o MenA y MenC.

En una forma de realización de la divulgación, la composición inmunógena comprende polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados a una proteína portadora, en la que al menos uno, dos, tres o cuatro o cada uno de los polisacáridos de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo o se clasifica por tamaño con un factor de hasta x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9, x10 o x20. Por ejemplo, el tamaño medio de al menos uno, dos, tres o cuatro o cada uno de los polisacáridos de *N. meningitidis* es superior a 50 kDa, 60 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa o 130 kDa.

"Polisacárido nativo" se refiere a un polisacárido que no ha sido sometido a un procedimiento, cuyo propósito es reducir el tamaño del polisacárido.

En un aspecto de la divulgación, la composición inmunógena comprende polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados a una proteína portadora, en la que al menos uno, dos, tres o cuatro o cada uno de los polisacáridos de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo.

En un aspecto de la divulgación, la composición inmunógena comprende polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados a una proteína portadora, en la que al menos uno, dos, tres o cuatro o cada uno de los polisacáridos de *N. meningitidis* se clasifica por tamaño con un factor de hasta x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 o x10.

En una forma de realización, el tamaño medio de al menos uno, dos, tres o cuatro o cada uno de los polisacáridos de *N. meningitidis*, cuando están presentes, está 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.

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

5 En una forma de realización, el sacárido MenC, cuando está presente, tiene un peso molecular de 100-200 kDa, 50-100 kDa, 100-150 kDa, 101-130 kDa, 150-210 kDa o 180-210 kDa.

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

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

Los pesos moleculares del sacárido se refieren al peso molecular del polisacárido medido antes de la conjugación y se mide por MALLS.

En una forma de realización, cualquier sacárido de *N. meningitidis* presente son polisacáridos nativos o polisacáridos nativos que han reducido de tamaño durante el proceso normal de extracción.

15 En una forma de realización, cualquier sacárido de *N. meningitidis* presente se clasifica por tamaño con escisión mecánica, por ejemplo, mediante microfluidización o sonicación. La microfluidización y sonicación tienen la ventaja de reducir suficientemente el tamaño de los polisacáridos nativos más grandes para proporcionar un conjugado filtrable.

20 En una forma de 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 a una proteína portadora, 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 medidas de polidispersidad se realizan mediante MALLS.

25 Para los análisis por MALLS de sacáridos de meningococo, se pueden usar 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 célula P100 y un filtro rojo a 498 nm).

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

30 En una forma de realización, el sacárido MenC, cuando está presente está al menos parcialmente O-acetilado de manera que al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las unidades de repetición NeuNAc unidas ($\alpha_2 \rightarrow 9$) están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones. Por ejemplo, la O-acetilación está presente en la posición O-7 y/u O-8.

35 En una forma de realización, el sacárido MenW, cuando está presente está al menos parcialmente O-acetilado de manera que al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones. Por ejemplo, la O-acetilación está presente en la posición O-7 y/u O-9.

40 En una forma de realización, el sacárido MenY, cuando está presente está al menos parcialmente O-acetilado de manera que al menos el 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones. Por ejemplo, la O-acetilación está presente en la posición O-7 y/u O-9.

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

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

45 Opcionalmente, la composición inmunógena o vacuna contiene una cantidad de un adyuvante suficiente para potenciar la respuesta inmunitaria al inmunógeno. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no están limitados a, sales de aluminio (fosfatos de aluminio o hidróxido de aluminio), mezclas de escualeno (SAF-1), péptido de muramilo, derivados de saponina, preparaciones de la pared celular de micobacterias, monofosforil lípido A, derivados del ácido micólico, tensioactivos de copolímeros en bloque no iónicos, Quil A, subunidad B de la toxina del cólera, polifosfaceno y derivados, y complejos inmunoestimuladores (ISCOMs) tales como aquellos descritos por
50 Takahashi y col. (1990) Nature 344:873-875.

Para las combinaciones HibMen descritas anteriormente, puede ser ventajoso no usar ningún adyuvante de sal de aluminio o ningún adyuvante en absoluto.

En una forma de realización, la composición inmunógena comprende un sacárido Hib conjugado al toxoide del tétanos a través de un enlazador y el sacárido MenC conjugado al toxoide del tétanos directamente o a través de un enlazador y el sacárido MenY conjugado al toxoide del tétanos.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención está tamponada, o ajustada a, entre pH 7,0 y 8,0, pH 7,2 y 7,6 o en torno o exactamente a pH 7,4.

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

Como ocurre con todas las composiciones inmunógenas o vacunas, las cantidades inmunológicamente eficaces de los inmunógenos se deben determinar empíricamente. Los factores a considerar incluyen la inmunogenicidad, si el inmunógeno se complejará, o se unirá covalentemente a un adyuvante o proteína portadora u otro vehículo, o no, la vía de administración y el número de dosificaciones inmunizadoras a administrar. Esos factores son conocidos en materia de vacunas y están dentro de los conocimientos de los inmunólogos que realizan esas determinaciones sin experimentación indebida.

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

Las preparaciones de vacuna de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar a un mamífero (por ejemplo, un paciente humano) susceptible de infección, por medio de la administración de dicha vacuna a través de una vía sistémica o de mucosa. Estas administraciones pueden incluir la inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante administración por una vía de mucosa en los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Se prefiere la administración por vía intranasal de vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media (puesto que se puede prevenir más eficazmente el transporte nasofaríngeo de neumococos, atenuando así la infección en su fase más temprana). Aunque la vacuna de la invención se puede administrar en forma de dosificación única, sus componentes también se pueden coadministrar juntos al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, si los sacáridos están presentes en una vacuna, éstos se podrían administrar por separado al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de una vacuna de proteínas bacterianas para la coordinación óptima de las respuestas inmunitarias entre sí). Además de una sola vía de administración, se pueden usar dos vías de administración diferentes. Por ejemplo, los antígenos víricos se pueden administrar i.d. (intradérmicamente), mientras que las proteínas bacterianas se pueden administrar i.m. (intramuscular) o i.n. (intranasalmente). Si los sacáridos están presentes, se pueden administrar i.m. (o i.d.) y las proteínas bacterianas se pueden administrar i.n. (o i.d.). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar i.m. para primeras dosis e i.n. para dosis de refuerzo.

La preparación de vacuna se describe de manera general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación dentro de liposomas se describe por Fullerton, patente de EE.UU. N° 4.235.877.

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

toxoides del tétanos (TT),
toxoides de la difteria (DT), y
componentes de *pertussis* de células enteras o acelulares

y un segundo contenedor que comprende:

conjugado de sacárido Hib, y
al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano,
en el que el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido inferior que la dosis de sacárido media de

todos los al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano;

o

conjugado de sacárido Hib, y
al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano,

- 5 en el que el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido inferior que cada uno de los al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano (por ejemplo, a una dosis de sacárido inferior que cualquier sacárido presente en la composición).

Ejemplos del conjugado Hib y los al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos son como se ha descrito anteriormente.

- 10 Un aspecto adicional de la divulgación es un kit de vacuna para la administración simultánea o secuencial que comprende dos composiciones inmunógenas multivalentes para conferir protección a un hospedador contra una enfermedad causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*. Por ejemplo, el kit comprende opcionalmente un primer contenedor que contiene:

- 15 uno o más conjugados de una proteína portadora y un sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* [en el que el sacárido(s) capsular procede opcionalmente de un serotipo de neumococo seleccionado del grupo constituido por 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 contenedor que comprende:

- 20 conjugado de sacárido Hib, y
al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano,
en el que el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido inferior que la dosis de sacárido media de todos los al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano;

o

conjugado de sacárido Hib, y
al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano,

- 25 en el que el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido inferior que cada uno de los al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano (por ejemplo, a una dosis de sacárido inferior que cualquier sacárido presente en la composición).

Ejemplos del conjugado Hib y los al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos son como se ha descrito anteriormente.

- 30 Normalmente, la vacuna de *Streptococcus pneumoniae* en el kit de vacuna de la presente invención comprenderá antígenos de polisacáridos (opcionalmente conjugados), en los que los polisacáridos se derivan de al menos cuatro serotipos de neumococo seleccionados del grupo constituido por 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.
- 35 Más opcionalmente, en la composición se incluyen al menos 7 serotipos, por ejemplo, aquellos derivados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F. Opcionalmente, en la composición se incluyen al menos 7 serotipos, por ejemplo, al menos 10, 11, 12, 13 o 14 serotipos. Por ejemplo, en una forma de realización la composición incluye 11 polisacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (opcionalmente conjugados). En una forma de realización de la invención se incluyen al menos 13 antígenos de polisacáridos
- 40 (opcionalmente conjugados), aunque también están contemplados por la invención antígenos de polisacáridos 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).

Los sacáridos de neumococos se conjugan a cualquier proteína portadora conocida, por ejemplo, el CRM197, el toxoide del tétanos, el toxoide de la difteria, la proteína D o cualquier otra proteína portadora como se ha mencionado anteriormente.

- 45 Opcionalmente, los kits de vacuna de la invención comprenden un tercer componente. Por ejemplo, el kit comprende opcionalmente un primer contenedor que contiene uno o más de:

toxoides del tétanos (TT),
toxoides de la difteria (DT), y
componentes de *pertussis* de células enteras o acelulares

- 50

y un segundo contenedor que comprende:

uno o más conjugados de una proteína portadora y un sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* [en el que el sacárido capsular procede opcionalmente de un serotipo de neumococo seleccionado del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y

33F].

y un tercer contenedor que comprende:

conjugado de sacárido Hib, y
al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano,
en el que el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido inferior que la dosis de sacárido media de
todos los al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano;

o

conjugado de sacárido Hib, y
al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano,
en el que el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido inferior que cada uno de los al menos otros dos
conjugados de sacárido bacteriano (por ejemplo, a una dosis de sacárido inferior que cualquier sacárido presente en
la composición).

Las composiciones inmunógenas que comprenden conjugados de meningococo, por ejemplo, HibMenC, HibMenAC, HibMenAW, HibMenAY, HibMenCW, HibMenCY, HibMenWY, MenAC, MenAW, MenAY, MenCW, MenCY, MenWY o MenACWY, que incluyen kits de composición similar a aquellos descritos anteriormente, comprenden opcionalmente antígenos del sarampión y/o las paperas y/o la rubéola y/o la varicela. Por ejemplo, la composición inmunógena de meningococo contiene antígenos del sarampión, las paperas y la rubéola o del sarampión, las paperas, la rubéola y la varicela. En una forma de realización, estos antígenos víricos están opcionalmente presentes en el mismo contenedor que el conjugado(s) de meningococo y/o sacárido Hib. En una forma de realización, estos antígenos víricos están liofilizados.

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la preparación de la composición inmunógena de la invención, que comprende la etapa de mezcla de un conjugado de sacárido Hib con al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos para formar una composición en la que el conjugado Hib está presente a una dosis de sacárido inferior que está entre el 20 % y el 60 % de la dosis de sacárido media de los al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos en la que los al menos dos conjugados de sacáridos bacterianos comprenden sacáridos capsulares de *N. meningitidis* derivados de cepas seleccionadas del grupo que consiste en los serogrupos A, C, W135 e Y.

La preparación de vacuna se describe de manera general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación dentro de liposomas se describe por Fullerton, patente de EE.UU. N° 4.235.877.

Un aspecto adicional de la divulgación es un procedimiento de inmunización de un hospedador humano contra una enfermedad causada por *Haemophilus influenzae* y opcionalmente infección por *N. meningitidis* que comprende la administración al hospedador de una dosis inmunoprotectora de la composición inmunógena o vacuna o kit de la invención.

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

Un aspecto adicional de la divulgación es el uso de la composición inmunógena o vacuna o kit de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por *Haemophilus influenzae* y opcionalmente *N. meningitidis*.

Los términos "que comprende", "comprenden" y "comprende" en el presente documento está previsto por los inventores que sean sustituibles de manera opcional con los términos "que consta de", "constan de" y "consta de", respectivamente, en cada caso.

La invención se ilustra en los ejemplos acompañantes. Los ejemplos siguientes se llevaron a cabo usando técnicas habituales, que son muy conocidas y rutinarias para aquellos expertos en la materia, excepto cuando se describa en detalle otra cosa. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - preparación de conjugados de polisacáridos

La unión covalente del polisacárido PRP de *Haemophilus influenzae* (Hib) a TT se llevó a cabo mediante química de acoplamiento desarrollada por Chu y col. (Infection and Immunity 1983, 40 (1); 245-256). El polisacárido PRP 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 la dihidrazida del ácido adípico (ADH) y se prosiguió con la incubación durante 90 minutos más. El PRP activado se acopló al toxoide del tétanos purificado mediante la condensación con carbodiimida usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). La EDAC se añadió al PRP activado para alcanzar una relación final de 0,6 mg de EDAC/mg de PRP activado. El pH se ajustó a 5,0 y se añadió al toxoide del tétanos purificado para alcanzar los 2

mg de TT/mg de PRP activado. La disolución resultante se dejó durante tres días con agitación suave. Después de la filtración a través de una membrana de 0,45 µm, el conjugado se purificó sobre una columna de Sephacryl S500HR (Pharmacia, Suecia) equilibrada en NaCl 0,2 M.

Los conjugados MenC-TT se produjeron usando polisacáridos nativos (por encima de 150 kDa como se mide mediante MALLS). Los conjugados MenA-TT se produjeron usando polisacárido nativo o polisacárido ligeramente microfluidizado por encima de 60 kDa como se mide mediante el procedimiento MALLS del ejemplo 2. Los conjugados MenW y MenY-TT se produjeron usando polisacáridos clasificados por tamaño en torno a 100-200 kDa como se mide por MALLS (véase ejemplo 2). La clasificación por tamaños fue por microfluidización usando un aparato homogenizador Emulsiflex C-50. A continuación los polisacáridos se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

La activación y el acoplamiento se llevaron a cabo como se describe en los documentos WO96/29094 y WO 00/56360. Resumiendo, el polisacárido a una concentración de 10-20 mg/ml en NaCl 2 M a pH 5,5-6,0 se mezcló con una disolución de CDAP (100 mg/ml recién preparados 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 incrementó con hidróxido sódico hasta pH 10,0. Después de tres minutos se añadió el toxoide del tétanos para 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 prosiguió 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 a pH 9,0. La mezcla se dejó durante 30 minutos. El conjugado se clarificó usando un filtro Kleenpak de 10 µm y a continuación se cargó sobre una columna de Sephacryl S400HR usando un tampón de elución de NaCl 150 mM, Tris 10 mM o 5 mM a pH 7,5. Los lotes clínicos se filtraron sobre una membrana de esterilización Opticap 4. Los conjugados resultantes tenían una relación promedio de polisacárido:proteína de 1:1-1:5 (p/p).

Para conjugar el polisacárido capsular MenA al toxoide del tétanos a través de un espaciador, se usó el siguiente procedimiento. La unión covalente del polisacárido y el espaciador (ADH) se llevó a cabo mediante química de acoplamiento por la que el polisacárido se activa en condiciones controladas mediante un agente cianilante, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP). El espaciador reacciona con el PS cianilado a través de los grupos hidracino, para formar un enlace isourea estable entre el espaciador y el polisacárido.

Una disolución de 10 mg/ml de MenA se trató con una disolución de 100 mg/ml recién preparada de CDAP en acetonitrilo/agua (50/50 (v/v)) para obtener una relación CDAP/MenA de 0,75 (p/p). Después de 1,5 minutos, el pH se incrementó a pH 10,0. Tres minutos más tarde, se añadió ADH para obtener una relación de ADH/MenA de 8,9. El pH de la disolución se redujo a 8,75 y la reacción prosiguió durante 2 horas.

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

Se añadió EDAC a la disolución de PSA_{AH} para alcanzar una concentración final de 0,9 mg de EDAC/mg de PSA_{AH}. El pH se ajustó a 5,0. El toxoide del tétanos purificado se añadió con una bomba peristáltica (en 60 minutos) para alcanzar los 2 mg de TT/mg de PSA_{AH}. La disolución resultante se dejó 60 minutos a 25°C en agitación para obtener un periodo de acoplamiento final de 120 minutos. El conjugado se clarificó usando un filtro de 10 µm y se purificó usando una columna de Sephacryl S400HR.

Ejemplo 2 - determinación del peso molecular usando MALLS

Los detectores se acoplaron a una columna de HPLC de exclusión por tamaños desde la que se eluyeron las muestras. Por una parte, el detector de dispersión de luz láser midió las intensidades luminosas dispersadas en 16 ángulos por la disolución macromolecular y por otra parte, un refractómetro interferométrico situado en línea permitió la determinación de la cantidad de muestra eluida. A partir de estas intensidades, se puede determinar el tamaño y la forma de las macromoléculas en disolución.

El peso molecular medio en peso (M_w) se define como la suma de los pesos de todas las especies multiplicado por sus respectivos pesos moleculares y dividido por la suma de pesos de todas las especies.

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

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

Peso molecular medio en número: $-M_n-$

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

c) Raíz cuadrada del radio medio: $-R_w$ y R_w^2 es el radio al cuadrado definido por:

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

($-m_i$ 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).

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

Los polisacáridos de meningococos se analizaron por MALLS cargando sobre dos columnas de HPLC (TSKG6000 y 5000PWxl) usadas en combinación. Se cargaron 25 µl de polisacáridos sobre la columna y se eluyó con 0,75 ml de agua filtrada. Los polisacáridos se detectaron 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 célula P100 y un filtro rojo a 498 nm).

Las polidispersidades de pesos moleculares y las recuperaciones de todas las muestras se calcularon mediante el procedimiento de Debye usando un ajuste polinómico de orden 1 en el software Astra 4.72.

Ejemplo 3. Ensayo clínico en fase II sobre vacuna de conjugado HibMenAC -TT mezclado con DTPw-HepB

Diseño del estudio: Estudio abierto, aleatorio (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: en lo sucesivo denominado 2,5/2,5/2,5
- Tritanrix™-HepB/Hib-M enAC 2,5/5/5: en lo sucesivo denominado 2,5/5/5
- Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 5/5/5: en lo sucesivo denominado 5/5/5
- Tritanrix™-HepB + Hiberix™: en lo sucesivo denominado Hiberix
- Tritanrix™-HepB/Hiberix™ + Meningitec™: en lo sucesivo denominado Meningitec.

Se tomaron muestras de sangre en el momento de la primera dosis de vacuna (Pre) y un mes después de la tercera dosis de vacuna (Post-dosis 3).

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

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

Tabla 1

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

Las formulaciones de vacuna Hib-MenAC se mezclaron extemporáneamente con Tritanrix-HepB. La vacuna de GSK Biologicals combinada con difteria-tétanos-células enteras de *Bordetella pertussis* - hepatitis B (DTPw-HB) (Tritanrix-HepB) contiene no menos de 30 Unidades Internacionales (UI) de toxoide de la difteria, no menos de 60 UI del toxoide del tétanos, no menos de 4 UI de *Bordetella pertussis* muerta y 10 µg de antígeno de superficie de hepatitis B recombinante.

Terapia de referencia, dosis, modo de administración, lote N.º:

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

Vacuna/composición/dosis/lote número: La vacuna Tritanrix™-HepB usada era como la descrita anteriormente.

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

Una dosis (0,5 ml) de vacuna MENINGITEC™ de Wyeth Lederle contenía: 10 µg de polisacárido capsular de meningococo del grupo C conjugado a 15 µg de proteína CRM197 de Corynebacterium diphtheria y aluminio en forma de sales.

Resultados -respuestas inmunitarias generadas contra Hib, MenA y MenC

Tabla 2a. Anti - PRP (µg/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95 % CL	UL	%	95 % CL	UL	%	95 % CL	UL	%	95 % CL	UL	%	95 % CL	UL
% ≥ 0,15	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL
	100	96,5	100	99,0	94,8	100	100	96,5	100	100	96,5	100	100	96,5	100
GMC	20,80	15,96	227,10	22,62	17,72	28,88	38,55	15,33	24,46	38,55	29,93	49,64	10,94	8,62	13,88

Tabla 2b. SBA-MenC

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

Tabla 2c. SBA MenA

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95 % CL		%	95 % CL		%	95 % CL		%	95 % CL		%	95 % CL	
	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL
% ≥ 1:8	99,7	91,9	99,7	100	95,8	100	100	96,2	100	6,8	2,5	14,3	9,1	4,0	17,1
GMC	316,7	251,4	398,9	418,5	358,6	488,5	363	310,5	424,4	5,6	4,3	7,4	5,6	4,4	7,2

Tabla 2d. Anti-PSC (µg/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95 % CL	UL	%	95 % CL	UL	%	95 % CL	UL	%	95 % CL	UL	%	95 % CL	UL
% ≥ 0,3	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL
	100	96,5	100	100	96,4	100	100	96,5	100	8,2	3,6	15,6	100	96,5	100
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 2e. Anti-PSA (µg/ml)

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

Conclusión

La vacuna del conjugado Hib MenAC con la formulación 2,5/5/5 dio de manera consistente respuestas inmunológicas de titulación superiores contra PRP, MenA y MenC que las formulaciones de vacuna del conjugado con cantidades iguales de los sacáridos Hib, MenA y MenC. Este efecto también se observó en ensayos con suero bactericida (SBA) en los que las mejores respuestas contra MenA y MenC se consiguieron usando la formulación 2,5/5/5 de la vacuna del conjugado Hib MenAC.

Ejemplo 4 - Ensayo clínico HibMenAC - primera dosis con conjugados HibMenAC

Se llevó a cabo un estudio abierto y aleatorio en fase II para valorar la memoria inmunológica inducida por el curso de la vacunación primaria de la vacuna Tritanrix™-HepB/HibMenAC, y para valorar la inmunogenicidad y reactogenicidad de una dosis de refuerzo de la vacuna Tritanrix™-HepB de GSK Biologicals mezclada con la vacuna del conjugado Hib-MenAC de GSK Biologicals o la vacuna Hib_{2,5} de GSK Biologicals de los 15 a 18 meses de edad en sujetos vacunados por primera vez con Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC. Cinco grupos recibieron los regímenes de vacunación primarios a las 6, 10 y 14 semanas de edad como se presenta en la tabla 3.

Tabla 3

Vacunación primaria	Grupo	A los 10 meses de edad	A los 15 a 18 meses de edad
Grupos de tratamiento			
Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2,5/2,5/2,5	1	dosis de 1/5º de Mencevax™ AC (10 µg MenA y 10 µg MenC) y 10 µg de PRP completo	Tritanrix™-HepB/Hib _{2,5}
	2	-	Tritanrix™-HepB/Hib _{2,5}
Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 5/5/5	3	dosis de 1/5º de Mencevax™ AC (10 µg MenA y 10 µg MenC) y 10 µg de PRP completo	Tritanrix™-HepB/Hib _{2,5}
	4	-	Tritanrix™-HepB/Hib _{2,5}
Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2,5/5/5	5	dosis de 1/5º de Mencevax™ AC (10 µg MenA y 10 µg MenC) y 10 µg de PRP completo	Tritanrix™-HepB/Hib _{2,5}
	6	-	Tritanrix™-HepB/Hib _{2,5}
Grupos control			
Tritanrix™-HepB + Hiberix™	7	dosis de 1/5º de Mencevax™ AC (10 µg MenA y 10 µg MenC) y 10 µg de PRP completo	Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC
	8	-	Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC
Tritanrix™-HepB / Hiberix™ + Meningitec™	9	dosis de 1/5º de Mencevax™ AC (10 µg MenA y 10 µg MenC) y 10 µg de PRP completo	Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC
	10	-	Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC
Se tomaron muestras de sangre de los Grupos 1, 3, 5, 7 y 9 en el momento del refuerzo con el polisacárido (PS) completo (es decir, Pre-PS - Mes 10) y un mes después del refuerzo con el polisacárido completo (es decir, Post-PS - Mes 11).			
Nota: Se han presentado los resultados de inmunogenicidad obtenidos en los cinco grupos que recibieron el refuerzo con el polisacárido completo (es decir, Grupos 1, 3, 5, 7 y 9).			

Número de sujetos: Planificados: 450 (45 sujetos por grupo)

Inscritos: En los Grupos 1, 3, 5, 7 y 9 que reciben el refuerzo con el polisacárido completo se inscribieron un total de 193 sujetos (42 en el Grupo 1, 39 en el Grupo 3, 37 en el Grupo 5, 36 en el Grupo 7 y 39 en el Grupo 9). Completado: No aplicable.

Inmunogenicidad: Cohorte total inscrita = 193 sujetos

Nota: En este estudio la cohorte total inscrita = cohorte total vacunada.

Diagnóstico y criterios para la inclusión: Un sujeto macho o hembra de 10 meses de edad que haya completado el curso de vacunación primaria de tres dosis descrito en el ejemplo 1, exento de problemas de salud obvios, que no haya recibido vacunación de refuerzo previa contra difteria, tétanos, *pertussis*, hepatitis B, serogrupos A o C de meningococo y/o enfermedad por Hib desde la visita de la conclusión del estudio primario. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de los padres/tutores del sujeto antes de su inclusión en el estudio.

Vacunas a estudio, dosis, modo de administración, lote N°: Todas las vacunas usadas en este estudio fueron desarrolladas y fabricadas por GSK Biologicals.

Calendario/sitio de vacunación: Sujetos de los Grupos 1, 3, 5, 7 y 9 recibieron la vacuna combinada de polisacárido

A y polisacárido C, dosis de 1/5^o de Mencevax™ AC y 10 µg de PRP completo en forma de inyección intramuscular en la zona anterolateral del muslo izquierdo y derecho a los 10 meses de edad, respectivamente.

Duración del tratamiento: La duración del estudio completo fue de 6 a 9 meses por sujeto aproximadamente que incluye la vacunación de refuerzo administrada a los 15 a 18 meses de edad. Se realizó un análisis provisional el mes 11 (es decir, un mes después de la administración del refuerzo con polisacárido completo el mes 10).

Criterios para la evaluación: Antes y un mes después de la administración del refuerzo con el polisacárido completo, los criterios para la evaluación de los Grupos 1, 3, 5, 7 y 9 fueron los siguientes:

- Titulación de anticuerpo SBA-MenA $\geq 1:8$
- Titulación de anticuerpo SBA-MenC $\geq 1:8$
- Concentración de anticuerpo anti-PSA $\geq 0,3$ µg/ml
- Concentración de anticuerpo anti-PSC $\geq 0,3$ µg/ml
- Concentración de anticuerpo anti-PRP $\geq 0,15$ µg/ml.

Procedimientos estadísticos: Este análisis provisional está basado en la cohorte inscrita total. Todos los análisis son puramente descriptivos y no se calculó ninguna interferencia estadística sobre ninguno de los puntos finales. Los análisis solamente se realizaron para los cinco grupos (es decir, los Grupos 1, 3, 5, 7 y 9) que recibieron el refuerzo del polisacárido completo a los 10 meses de edad. Aunque estos cinco grupos eran subgrupos de los grupos principales en el estudio primario, los resultados se presentan como para la localización del grupo de estudio primario.

Análisis de inmunogenicidad: Los resultados obtenidos en tres puntos se presentan en este ejemplo, a saber - un mes después de la tercera dosis de vacuna en el estudio de vacunación primaria (Ejemplo 1), antes de la administración del refuerzo del polisacárido (es decir a los 10 meses de edad) para la evaluación de la persistencia de la respuesta inmunológica después de la vacunación primaria y un mes después de la administración del refuerzo del polisacárido (es decir, a los 11 meses de edad) para la evaluación de la memoria inmunológica inducida por la vacunación primaria. En cada punto temporal: Se tabuló la media geométrica de las concentraciones o títulos de anticuerpo (GMCs o GMTs) con intervalos de confianza (ICs) del 95 % para el ensayo con suero bactericida (SBA)-MenC, SBA-MenA, anti-PSC, anti-PSA y anti-PRP. Se calculó la seropositividad o tasas de seroprotección con unos ICs exactos del 95 % para cada anticuerpo. Se investigaron las concentraciones o títulos de anticuerpo antes del refuerzo con el polisacárido y un mes después del refuerzo con el polisacárido usando curvas acumulativas inversas (RCCs) para cada antígeno y serotipo.

Resultados

Resultados demográficos: La media de edad de la cohorte inscrita total fue de 43,2 semanas con una desviación estándar de 6,5 semanas. La relación de varones a féminas fue de 1,3 (110/83). Todos los sujetos pertenecían a la raza asiática oriental o asiática suroriental.

Resultados de inmunogenicidad: Los resultados de inmunogenicidad para la cohorte inscrita total se presentan en la tabla 4.

Tabla 4a

Anticuerpo	Grupo	Tiempo		95 % IC (LL, UL)		GMC/ GMT	95 % IC (LL, UL)	
Anti-PRP (% $\geq 0,15$ µg/ml)	2,5/2,5/2,5	PIII(M3)	100,0	91,6	100,0	17,872	11,358	28,123
		PRE-PS	97,5	86,8	99,9	6,940	4,402	10,941
		POST-PS	100,0	91,6	100,0	66,510	38,690	114,334
	5/5/5	PIII(M3)	100,0	91,0	100,0	17,306	11,477	26,095
		PRE-PS	94,9	82,7	99,4	4,520	2,946	6,937
		POST-PS	100,0	91,0	100,0	44,418	26,595	74,186
	2,5/5/5	PIII(M3)	100,0	90,5	100,0	22,484	15,217	33,223
		PRE-PS	100,0	89,7	100,0	5,092	3,290	7,883
		POST-PS	100,0	90,5	100,0	54,244	32,251	91,234
	Hiberix™	PIII(M3)	100,0	90,3	100,0	30,106	18,316	49,485
		PRE-PS	100,0	90,3	100,0	5,105	3,238	8,049
		POST-PS	100,0	90,3	100,0	37,049	21,335	64,336

(continuación)

Anticuerpo	Grupo	Tiempo		95 % IC (LL, UL)		GMC/ GMT	95 % IC (LL, UL)	
Anti-PRP (% ≥ 0,15 µg/ml)	Meningitec™	PIII(M3)	100,0	91,0	100,0	12,257	8,234	18,246
		PRE-PS	100,0	91,0	100,0	4,227	2,804	6,372
		POST-PS	100,0	91,0	100,0	24,354	15,308	38,747
SBA-MenA (% ≥ 1:8)	2,5/2,5/2,5	PIII(M3)	97,1	84,7	99,9	342,3	230,7	507,9
		PRE-PS	91,7	77,5	98,2	161,9	93,9	279,1
		POST-PS	100,0	88,4	100,0	737,2	577,3	941,4
	5/5/5	PIII(M3)	100,0	90,0	100,0	394,6	297,8	523,0
		PRE-PS	94,3	80,8	99,3	193,2	126,7	294,7
		POST-PS	96,7	82,8	99,9	720,8	479,8	1082,7
	2,5/5/5	PIII(M3)	100,0	90,0	100,0	385,8	285,9	520,5
		PRE-PS	88,2	72,5	96,7	162,7	95,8	276,2
		POST-PS	100,0	88,4	100,0	929,9	718,4	1203,6
	Hiberix™	PIII(M3)	10,0	2,1	26,5	6,6	3,7	11,7
		PRE-PS	72,7	54,5	86,7	96,9	46,0	204,1
		POST-PS	100,0	89,4	100,0	631,8	475,5	839,4
	Meningitec™	PIII(M3)	6,9	0,8	22,8	4,8	3,6	6,4
		PRE-PS	80,0	63,1	91,6	119,7	62,7	228,3
		POST-PS	92,1	78,6	98,3	449,9	271,7	745,0
SBA-MenC (% ≥ 1:8)	2,5/2,5/2,5	PIII(M3)	100,0	91,6	100,0	3342,3	2466,9	4528,3
		PRE-PS	90,5	77,4	97,3	322,3	190,2	546,1
		POST-PS	100,0	91,6	100,0	2713,5	1909,4	3856,2
	5/5/5	PIII(M3)	100,0	91,0	100,0	3863,1	3025,9	4932,1
		PRE-PS	97,3	85,8	99,9	463,9	292,9	734,7
		POST-PS	100,0	91,0	100,0	2377,3	1665,4	3393,4
	2,5/5/5	PIII(M3)	100,0	90,5	100,0	5339,0	3829,4	7443,6
		PRE-PS	94,6	81,8	99,3	451,4	281,7	723,5
		POST-PS	100,0	90,3	100,0	2824,7	2048,1	3895,8
	Hiberix™	PIII(M3)	2,8	0,1	14,5	4,5	3,6	5,7
		PRE-PS	5,7	0,7	19,2	4,8	3,6	6,4
		POST-PS	17,6	6,8	34,5	9,8	4,8	19,7
	Meningitec™	PIII(M3)	100,0	91,0	100,0	4557,8	3539,3	5869,5
		PRE-PS	97,4	86,5	99,9	347,7	221,6	545,4
		POST-PS	100,0	91,0	100,0	1557,7	1090,8	2224,4
95 % IC: Intervalo de confianza del 95 %; LL: Límite inferior; UL: Límite superior; GMC/GMT: Media geométrica de la concentración/ Media geométrica de títulos PIII(M 3): Muestra de sangre post-vacunación obtenida un mes después de la vacunación primaria de tres dosis PRE-PS: Muestra de sangre obtenida antes del refuerzo con el polisacárido completo el mes 10 POST-PS: Muestra de sangre obtenida un mes después del refuerzo con el polisacárido completo								

Tabla 4b

Anticuerpo	Grupo	Tiempo		95 % IC (LL, UL)		GMC/ GMT	95 % IC (LL, UL)	
Anti- PSA (% ≥ 0,3 µg/ml)	2,5/2,5/2,5	PIII(M3)	100,0	91,2	100,0	17,64	13,52	23,02
		PRE-PS	92,5	79,6	98,4	1,79	1,22	2,62
		POST-PS	100,0	91,6	100,0	23,58	16,76	33,17

(continuación)

Anticuerpo	Grupo	Tiempo		95 % IC (LL, UL)		GMC/ GMT	95 % IC (LL, UL)	
Anti- PSA (% ≥ 0,3 µg/ml)	5/5/5	PIII(M3)	100,0	91,0	100,0	26,06	20,30	33,45
		PRE-PS	97,4	86,5	99,9	2,25	1,60	3,18
		POST-PS	100,0	91,0	100,0	24,13	17,64	33,01
	2,5/5/5	PIII(M3)	100,0	90,3	100,0	24,03	18,84	30,65
		PRE-PS	91,2	76,3	98,1	1,47	0,99	2,19
		POST-PS	100,0	90,5	100,0	22,68	15,81	32,54
	Hiberix™	PIII(M3)	0,0	0,0	10,3	0,15	0,15	0,15
		PRE-PS	5,6	0,7	18,7	0,16	0,15	0,17
		POST-PS	75,8	57,7	88,9	1,03	0,55	1,93
	Meningitec™	PIII(M3)	2,6	0,1	13,8	0,16	0,14	0,17
		PRE-PS	7,7	1,6	20,9	0,16	0,15	0,18
		POST-PS	66,7	49,8	80,9	0,84	0,49	1,42
Anti-PSC (% ≥ 0,3 µg/ml)	2,5/2,5/2,5	PIII(M3)	100,0	91,6	100,0	48,45	39,65	59,20
		PRE-PS	100,0	91,2	100,0	7,11	5,69	8,84
		POST-PS	100,0	91,2	100,0	21,55	17,24	26,94
	5/5/5	PIII(M3)	100,0	91,0	100,0	56,42	48,16	66,11
		PRE-PS	100,0	91,0	100,0	8,32	6,74	10,28
		POST-PS	100,0	90,0	100,0	22,32	18,21	27,36
	2,5/5/5	PIII(M3)	100,0	90,3	100,0	76,98	62,69	94,53
		PRE-PS	100,0	89,7	100,0	8,64	6,93	10,77
		POST-PS	100,0	90,5	100,0	24,75	19,37	31,61
	Hiberix™	PIII(M3)	6,1	0,7	20,2	0,16	0,15	0,18
		PRE-PS	0,0	0,0	9,7	0,15	0,15	0,15
		POST-PS	100,0	90,3	100,0	8,05	5,73	11,30
	Meningitec™	PIII(M3)	100,0	91,0	100,0	59,05	48,16	72,41
		PRE-PS	100,0	91,0	100,0	7,33	5,51	9,75
		POST-PS	100,0	90,7	100,0	17,13	13,38	21,94
95 % IC: Intervalo de confianza del 95 %; LL: Límite inferior; UL: Límite superior; GMC/GMT: Media geométrica de la concentración/ Media geométrica de títulos PIII(M 3): Muestra de sangre post-vacunación obtenida un mes después de la vacunación primaria de tres dosis PRE-PS: Muestra de sangre obtenida antes del refuerzo con el polisacárido completo el mes 10 POST-PS: Muestra de sangre obtenida un mes después del refuerzo con el polisacárido completo								

Conclusión

- 5 La formulación de vacuna del conjugado HibMenAC 2,5/5/5 que contiene una cantidad inferior de Hib tendía a dar una mejor respuesta de memoria inmunológica a MenA y MenC en ensayos SBA que las formulaciones de vacuna que contienen cantidades iguales de los tres conjugados. Esto se puede observar con una comparación de las lecturas POST-PS. Por tanto, el uso de la formulación 2,5/5/5 en la primera dosis da como resultado una respuesta de memoria inmunitaria superior.

- 10 Mirando los datos del PIII (M3), se observan lecturas superiores para la formulación 2,5/5/5 para Hib (22,5 vs. 17) y MenC (76 vs. 48 o 56 y 5339 vs. 3342 o 3863 por SBA).

Ejemplo 5a: Ensayo clínico usando HibMenCY administrado simultáneamente con Infanrix penta y Prevenar en niños a los 2, 4 y 6 meses

- 15 Diseño del estudio: Un estudio multicéntrico en fase II, abierto (parcialmente doble ciego*), aleatorio (1:1:1:1:1), controlado, con cinco grupos paralelos que recibieron vacunas simultáneas de la manera siguiente en forma de curso de vacunación primario de tres dosis a la edad de 2, 4 y 6 meses:

- Grupo Hib-MenCY 2,5/5/5 : Hib-MenCY (2,5/5/5) + Infanrix® penta + Prevenar®
- Grupo Hib-MenCY 5/10/10 : Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix® penta + Prevenar®
- Grupo Hib-MenCY 5/5/5 : Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix® penta + Prevenar®
- Grupo Menjugate : Menjugate® + Act HIB® + Infanrix® penta**
- Grupo ActHIB : ActHIB® + Infanrix® penta + Prevenar®

* Se administró Hib-MenCY (2,5/5/5) y Hib-MenCY (5/10/10) como doble ciego. La formulación Hib-MenCY (5/5/5) no se pudo administrar como doble ciego puesto que se preparó reconstituyendo una formulación Hib-MenCY (10/10/10) con 1,0 ml de diluyente (la mitad de la disolución se descartó y se administraron los 0,5 ml restantes), mientras que las formulaciones Hib-MenCY (2,5/5/5) y Hib-MenCY (5/10/10) se administraron después de la reconstitución con 0,5 ml de diluyente.

** A sujetos de este grupo se les dará dos dosis de una vacuna del conjugado de neumococo registrada al final del estudio de refuerzo 792014/002 según la información prescrita.

Se obtuvieron muestras de sangre (4,0 ml) de todos los sujetos antes y un mes después de completar el curso de vacunación primaria (Estudio en el mes 0 y Estudio en el mes 5).

El estudio se planificó para que fuera sobre 400 sujetos con 80 sujetos en cada uno de los cinco grupos. El estudio se completó con un total de 398 sujetos (Grupo Hib-MenCY 2,5/5/5: 80; Grupo Hib-MenCY 5/10/10: 81; Grupo Hib-MenCY 5/5/5: 78; Grupo Menjugate: 81; Grupo ActHIB: 78).

Calendario/sitio de vacunación: Se inyectó intramuscularmente tres dosis a intervalos de dos meses, a los 2, 4 y 6 meses de edad aproximadamente de la manera siguiente:

Tabla 5: Vacunas administradas y sitio

Grupo	Vacunas administradas en el muslo izquierdo	Vacunas administradas en el muslo derecho
Hib-MenCY 2,5/5/5	Hib-TT (2,5 µg)-MenC-TT (5 µg)-MenY-TT (5 µg)	· DTPa-HBV-IPV (Infanrix® penta): superior · Pneumococco (Prevenar®): inferior
Hib-MenCY 5/10/10	Hib-TT (5 µg)-MenC-TT (10 µg)-MenY-TT (10 µg)	· DTPa-HBV-IPV (Infanrix® penta): superior · Pneumococco (Prevenar®): inferior
Hib-MenCY 5/5/5	Hib-TT (5 µg)-MenC-TT (5 µg)-MenY-TT (5 µg)	· DTPa-HBV-IPV (Infanrix® penta): superior · Pneumococco (Prevenar®): inferior
Menjugate®	ActHIB®	· DTPa-HBV-IPV (Infanrix® penta): superior · MenC (Menjugate®): inferior
ActHIB®	ActHIB®	· DTPa-HBV-IPV (Infanrix® penta): superior · Pneumococco (Prevenar®): inferior

Tabla 6: Formulación de vacuna candidata y números de lote

Vacuna	Formulación: contenido/dosis	Presentación	N.º de lote (N.º de lote de diluyente)
Hib-MenCY 2,5/5/5	Polirribosil ribitol (PRP) del polisacárido capsular de <i>H. influenzae</i> tipo b 2,5 µg conjugado a toxoide del tétanos (TT); polisacárido capsular del serogrupo C de <i>N. meningitidis</i> (PSC) 5 µg conjugado a TT; polisacárido capsular del serogrupo Y de <i>N. meningitidis</i> (PSY) 5 µg conjugado a TT;	Pellas liofilizadas en vial monodosis (0,5 ml después de su reconstitución con diluyente salino)	DCYH003A48 (01B20/22A)
Hib-MenCY 5/10/10	PRP 5 µg conjugado a TT; PSC 10 µg conjugado a TT; PSY 10 µg conjugado a TT	Pellas liofilizadas en vial monodosis (0,5 ml después de su reconstitución con diluyente salino)	DCYH002A48 (01B20/22A)
Hib-MenCY 5/5/5	PRP 5 µg conjugado a TT; PSC 10 µg conjugado a TT; PSY 10 µg conjugado a TT	Pellas liofilizadas en vial monodosis.*	DCYH001A48 (01B20/22A)

* El Hib-MenCY 5/5/5 se preparó disolviendo la formulación Hib-MenCY 10/10/10 con 1,0 ml de diluyente; se administraron 0,5 ml y los 0,5 ml restantes se desecharon.

Criterios para la evaluación:

Inmunogenicidad: Medición de los títulos/concentraciones de anticuerpos contra cada antígeno de vacuna antes de la primera dosis (mes 0) y aproximadamente un mes después de la tercera dosis (mes 5) en todos los sujetos. Determinación de los títulos de anticuerpo bactericida contra los serogrupos C e y (SBA-MenC y SBA-MenY) de *N. meningitidis* mediante una prueba bactericida (límites de ensayo: una dilución de 1:8 y 1:128) y medida de ELISA de

anticuerpos contra los serogrupos C e y (anti-PSC y anti-PSY, límites de ensayo $\geq 0,3 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 2 \mu\text{g/ml}$) de *N. meningitidis*, el PRP del polisacárido Hib (anti-PRP, límites de ensayo $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$), los tres antígenos de *pertussis* (anti-PT, anti-FHA, anti-PRN, límite de ensayo $\geq 5 \text{ EL.U/ml}$), anticuerpos para el antígeno de superficie de la hepatitis B (anti-HBs, límite de ensayo $\geq 10 \text{ ml U/ml}$), toxoides de la difteria y del tétanos (anti-difteria y anti-tétanos, límite de ensayo $0,1 \text{ IU/ml}$); anti-poliovirus tipos 1, 2 y 3 (límite de ensayo 1:8); siete serotipos de neumococo anti-4, anti-6B, anti-9V, anti-14, anti-18C, anti-19F, anti-23F (límite de ensayo $0,05 \mu\text{g/ml}$). La respuesta de la vacuna primaria a los antígenos de *pertussis* se definió como la seropositividad (anticuerpos detectables) después de la tercera dosis en sujetos con anticuerpos previamente indetectables o al menos el mantenimiento de la concentración de anticuerpos antes de la vacunación en sujetos que inicialmente eran seropositivos.

- 10 **Seguridad** (criterios para la evaluación): Seguimiento de 8 días (Días 0 a 7), después de la administración de cada dosis de vacuna, de síntomas solicitados locales (dolor, enrojecimiento, hinchazón) y generales (somnolencia, fiebre, irritabilidad, y pérdida de apetito) informado por los padre(s)/tutor(es) de los sujetos en tarjetas diarias; seguimiento de 31 días (Días 0 a 30), después de cada dosis de vacuna, de casos adversos no severos no solicitados; y de casos adversos severos (SAEs) durante todo el periodo de estudio.

15 **Procedimientos estadísticos:**

Inmunogenicidad

- 20 ☐ Se tabuló la media geométrica de las concentraciones o títulos de anticuerpo (GMC/Ts) con intervalos de confianza (ICs) del 95 % para cada antígeno. El cálculo de GMC/Ts se llevó a cabo tomando el anti-logarítmico en base 10 (anti-log10) de la media de las 10 transformaciones bajas de concentración o de títulos. A las concentraciones o títulos de anticuerpo por debajo del límite del ensayo se les dio un valor arbitrario de la mitad del límite para el propósito del cálculo de la GMC/T. Se calcularon los porcentajes de sujetos con una concentración/títulos de anticuerpo por debajo de los límites del ensayo especificados o con una respuesta de vacuna con un IC exacto del 95 %. Las concentraciones/títulos de anticuerpos se investigaron usando curvas de anticuerpos acumulativas inversas para cada antígeno después de la vacunación. Se tabuló la distribución de la concentración de anticuerpo para los 7 antígenos de neumococo.
- 25 ☐ Las diferencias entre los grupos Hib-MenCY, comparados con el grupo control se evaluaron de manera exploratoria para cada anticuerpo, excepto para SBA-MenY y anti-PSY, en términos de (1) la diferencia entre el grupo control (menos) los grupos Hib-MenCY para el porcentaje de sujetos por encima de los límites especificados o con una respuesta de vacuna con sus IC del 95 % asintóticos estandarizados, (2) las relaciones de GMC o GMT del grupo control sobre los grupos Hib-MenCY con sus IC del 95 %. El grupo control era el Menjugate para SBA-MenC y anti-PSC; el grupo control para todos los otros antígenos era el Grupo ActHIB. Se realizaron las mismas comparaciones para evaluar la diferencia entre cada par de formulaciones Hib-MenCY para los anticuerpos anti-PRP, SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY y anti-tétanos.

Tasas de seroprotección/seropositividad y GMC/Ts (cohorte de ATP para la inmunogenicidad)

35 Tabla 7a. Anti-PRP ($\mu\text{g/ml}$)

Grupo	N	% $\geq 0,15$	LL	UL	≥ 1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	74	1100,0	95,1	100,0	97,3	90,6	99,7	6,441	5,315	7,805
Hib MenCY 5/10/10	76	100,0	95,3	100,0	98,7	92,9	100,0	7,324	5,877	9,127
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	92,9	84,1	97,6	5,577	4,375	7,110
Menjugate™	74	98,6	92,7	100,0	89,2	79,8	95,2	4,465	3,399	5,865
ActHIB™	74	100,0	95,1	100,0	94,6	86,7	98,5	5,714	4,538	7,195

Tabla 7b SBA -MenC (1/Dil)

Grupo	N	% $\geq 0,15$	LL	UL	≥ 1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100,0	94,8	100,0	98,6	92,2	100,0	1293,1	1027,7	1627,1
Hib MenCY 5/10/10	76	100,0	95,3	100,0	97,4	90,8	99,7	1065,6	858,8	1322,3
Hib MenCY 5/5/5	72	100,0	95,3	100,0	95,8	88,3	99,1	968,4	770,8	1216,6
Menjugate™	74	100,0	95,1	100,0	98,6	92,7	100,0	1931,9	1541,2	2421,6
ActHIB™	76	1,3	0,0	7,1	0,0	0,0	4,7	4,2	3,8	4,5

Tabla 7c Anti-PSC (µg/ml)

Grupo	N	% ≥ 0,15	LL	UL	≥ 1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	63	100,0	94,3	100,0	98,4	91,5	100,0	12,02	9,90	14,59
Hib MenCY 5/10/10	65	100,0	94,5	100,0	100,0	94,5	100,0	12,09	10,59	13,81
Hib MenCY 5/5/5	61	100,0	94,1	100,0	98,4	91,2	100,0	9,95	8,34	11,87
Menjugate™	62	100,0	94,2	100,0	100,0	94,2	100,0	15,36	12,67	18,62
ActHIB™	63	1,6	0,0	8,5	0,0	0,0	5,7	0,15	0,15	0,16

Tabla 7d SBA-MenY (1/Dil)

Grupo	N	% ≥ 0,15	LL	UL	≥ 1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	67	98,5	92,0	100,0	95,5	87,5	99,1	843,5	640,1	1111,7
Hib MenCY 5/10/10	68	100,0	94,7	100,0	97,1	89,8	99,6	1020,0	790,0	1316,8
Hib MenCY 5/5/5	69	98,6	92,2	100,0	89,9	80,2	95,8	741,8	538,0	1022,9
Menjugate™	68	14,7	7,3	25,4	8,8	3,3	18,2	6,9	5,0	9,5
ActHIB™	74	16,2	8,7	26,6	9,5	3,9	18,5	7,3	5,2	10,1

5

Tabla 7e Anti - PSY (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	100,0	94,6	100,0	19,22	15,42	23,95
Hib MenCY 5/10/10	70	100,0	94,9	100,0	98,6	92,3	100,0	19,09	15,44	23,59
Hib MenCY 5/5/5	72	100,0	95,0	100,0	97,2	90,3	99,7	15,83	12,64	19,82
Menjugate™	66	3,0	0,4	10,5	0,0	0,0	5,4	0,16	0,15	0,17
ActHIB™	69	0,0	0,0	5,2	0,0	0,0	5,2	0,15	0,15	0,15

Conclusión

Las formulaciones 2,5/5/5 y 5/10/10 dieron como resultado títulos superiores contra Hib, MenA y MenC en términos de inmunogenicidad y resultados SBA. Por tanto, la inclusión de dosis inferiores del conjugado Hib en una vacuna de conjugado combinada dio resultados superiores.

10

La coadministración de Hib-MenCY con Infanrix penta y Prevenar dio resultados satisfactorios.

Ejemplo 5b. Efecto de la coadministración de HibMenCY con Prevenar en la respuesta a polisacáridos de neumococo

Un aspecto adicional del estudio del ejemplo 3 fue investigar el nivel de anticuerpos expandidos contra los 7 polisacáridos de neumococo presentes en la vacuna Prevenar para valorar el efecto de la coadministración de HibMenCY sobre los títulos de anticuerpo expandido contra polisacáridos de neumococo.

15

Las GMC y los porcentajes de sujetos con anticuerpos para los 7 serotipos de neumococo $\geq 0,05$ µg/ml y $\geq 0,2$ µg/ml se muestran en la Tabla 8. Excepto para el serotipo 6B, las tasas de seropositividad para los componentes 7vPn abarcaban entre el 95,5-100 % (concentraciones de anticuerpo $\geq 0,05$ µg/ml) y el 93,9-100 % (concentraciones de anticuerpo $\geq 0,2$ µg/ml) en todos los grupos. Para el serotipo 6B, las tasas de seropositividad abarcaban entre el 88,4-98,6 % (concentraciones de anticuerpo $\geq 0,05$ µg/ml) y el 81,2-91,4 % (concentraciones de anticuerpo $\geq 0,2$ µg/ml) en todos los grupos (grupo ActHIB: 92,3 % $\geq 0,05$ µg/ml; 86,2 % $\geq 0,2$ µg/ml).

20

Tabla 8a Anti-4

Grupo	Nº en el grupo	% ≥ 0,05 µg/ml	% ≥ 0,2 µg/ml	GMC (µg/ml)
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100 %	100 %	2,101
Hib MenCY 5/10/10	70	100 %	100 %	2,049
Hib MenCY 5/5/5	69	100 %	100 %	2,023

ES 2 662 651 T3

(continuación)

Grupo	Nº en el grupo	% $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$	% $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$	GMC ($\mu\text{g/ml}$)
Menjugate™	58	3,4 %	1,7 %	0,024
ActHIB™	66	100 %	100 %	2,062

Tabla 8b Anti-6B

Grupo	Nº en el grupo	% $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$	% $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$	GMC ($\mu\text{g/ml}$)
Hib MenCY 2,5/5/5	68	95,6 %	85,3 %	1,060
Hib MenCY 5/10/10	70	98,6 %	91,4 %	1,079
Hib MenCY 5/5/5	69	88,4 %	81,2 %	0,834
Menjugate™	63	4,8 %	1,6 %	0,027
ActHIB™	65	92,3 %	86,2 %	0,879

Tabla 8c Anti-9V

Grupo	Nº en el grupo	% $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$	% $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$	GMC ($\mu\text{g/ml}$)
Hib MenCY 2,5/5/5	68	100 %	100 %	3,102
Hib MenCY 5/10/10	71	98,6 %	97,2 %	2,363
Hib MenCY 5/5/5	71	100 %	100 %	2,823
Menjugate™	62	4,8 %	1,6 %	0,028
ActHIB™	67	98,5 %	98,5 %	2,651

Tabla 8d Anti-14

Grupo	Nº en el grupo	% $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$	% $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$	GMC ($\mu\text{g/ml}$)
Hib MenCY 2,5/5/5	65	100 %	98,5 %	4,095
Hib MenCY 5/10/10	65	100 %	100 %	5,592
Hib MenCY 5/5/5	68	100 %	100 %	4,309
Menjugate™	49	49 %	14,3 %	0,062
ActHIB™	65	100 %	98,5 %	4,372

Tabla 8e Anti-18C

Grupo	Nº en el grupo	% $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$	% $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$	GMC ($\mu\text{g/ml}$)
Hib MenCY 2,5/5/5	67	98,5 %	98,5 %	3,518
Hib MenCY 5/10/10	71	100 %	98,6 %	2,969
Hib MenCY 5/5/5	72	100 %	100 %	2,936
Menjugate™	65	7,7 %	3,1 %	0,029
ActHIB™	67	98,5 %	97 %	3,326

Tabla 8f Anti-19F

Grupo	Nº en el grupo	% $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$	% $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$	GMC ($\mu\text{g/ml}$)
Hib MenCY 2,5/5/5	65	100 %	100 %	2,303
Hib MenCY 5/10/10	67	98,5 %	98,5 %	1,846
Hib MenCY 5/5/5	66	100 %	100 %	2,061
Menjugate™	56	12,5 %	3,6 %	0,030
ActHIB™	65	100 %	96,9 %	1,881

Tabla 8g Anti-23F

Grupo	Nº en el grupo	% $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$	% $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$	GMC ($\mu\text{g/ml}$)
Hib MenCY 2,5/5/5	66	98,5 %	97 %	2,581
Hib MenCY 5/10/10	68	97,1 %	94,1 %	2,112
Hib MenCY 5/5/5	70	95,7 %	95,7 %	2,098
Menjugate™	59	5,1 %	0,0 %	0,027
ActHIB™	66	95,5 %	93,9 %	1,988

Conclusión

La coadministración de las tres formulaciones de HibMenCY con Prevnar condujo a respuestas inmunitarias satisfactorias contra los siete serotipos de neumococo. El serotipo 6B es un inmunógeno difícil contra el que generar una respuesta. En el caso de 6B, se consiguieron una GMC y un porcentaje de sujetos que alcanzan los dos niveles umbrales más elevados usando las formulaciones Hib de dosis inferior de HibMenC. Por tanto, los usos de vacunas de conjugado Hib de dosis inferior para la coadministración con conjugados de polisacáridos de neumococo dan lugar a una mejor respuesta contra el antígeno 6B.

Ejemplo 6 - Ensayo clínico en fase II que administra Hib MenCY simultáneamente con Infanrix

penta según un calendario de 2, 3 y 4 meses

Diseño del estudio: Un estudio multicéntrico en fase II, abierto (parcialmente doble ciego*) aleatorio y controlado con 5 grupos que reciben un calendario primario de tres dosis con vacunas de la manera siguiente:

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

*Hib-MenCY 2,5/5/5, Hib-MenCY 5/10/10 y Hib-MenC se administraron como doble ciego mientras que el grupo Hib-MenCY 5/5/5 y el grupo Menjugate eran abiertos.

**Menjugate™ es la vacuna que se administró a todos los sujetos en el grupo. Vacunación a los +/- 2, 3, 4 meses de edad (Estudio en el mes 0, mes 1 y mes 2), y las muestras de sangre (3,5 ml) de todos los sujetos antes y un mes después de la vacunación primaria (Estudio en el mes 0 y mes 3).

Vacuna a estudio, dosis, modo de administración, número de lote: Se inyectaron intramuscularmente tres dosis con intervalos de un mes, a los 2, 3 y 4 meses de edad aproximadamente, de la manera siguiente:

Tabla 8: Vacunas administradas (estudio y control), grupo, calendario/sitio y dosis

Grupo	Calendario (meses de edad)	Dosis de vacuna administrada Sitio- muslo superior izquierdo	Dosis de vacuna administrada Sitio- muslo superior 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 (10 μg)-MenY-TT (10 μg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenCY 5/5/5	2, 3, y 4	Hib (5 μg)-MenC-TT (5 μg)- MenY-TT (5 μg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenC	2, 3, y 4	Hib (5 μg)-Men C (5 μg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Menjugate™	2, 3, y 4	Menjugate™	DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix™ hexa)

Inmunogenicidad: Medición de los títulos/concentraciones de 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 del suero bactericida contra los serogrupos C e Y de *N. meningitidis* (límite de SBA-MenC y SBA-MenY: 1:8 y 1:128); ensayos de ELISA con límites: $\geq 0,3 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ para polisacáridos anti-serogrupos C e Y de *N. meningitidis* (IgG anti-PSC e IgG anti-PSY); $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$ para polirribosil-ribitol-fosfato de polisacárido Hib (IgG anti-PRP); 5 EL.U/ml para anti-FHA, anti-PRN, anti-PT; $\geq 0,1 \text{ IU/ml}$ anti-

toxóide del tétanos (anti-TT). Sólo un mes después de la tercera dosis (mes 3) en todos los sujetos para: anti-D, anti-HBs y anti-polio 1, 2 y 3. Usando ensayos de ELISA con límites: 0,1 IU/ml para anti-difteria (anti-D); ≥ 10 mIU/ml para antihepatitis B (anti-HBs); y límite de la prueba de microneutralización: 1:8 para anti-polio tipo 1, 2 y 3 (anti-polio 1, 2 y 3).

5 Procedimientos estadísticos:

Las tasas de seroprotección/seropositividad y la media geométrica de las concentraciones/títulos (GMCs/GMTs) con intervalos de confianza del 95 % (95 % IC) se trataron por ordenador para cada grupo, para SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY, anti-PRP, anti-tétanos, anti-PT, anti-FHA y anti-PRN antes y un mes después de la vacunación, para anti-difteria, anti-HBs, anti-Polio 1, anti-Polio 2 y anti-Polio 3 un mes después de la vacunación. También se trató por ordenador la respuesta de la vacuna (aparición de anticuerpos en sujetos inicialmente seronegativos o al menos el mantenimiento de las concentraciones de anticuerpo en sujetos inicialmente seropositivos) con un intervalo de confianza del 95 % para anti-PT, anti-PRN y anti-FHA un mes después de la vacunación. También se presentan las curvas acumulativas inversas para cada anticuerpo en el mes 3. Las diferencias entre los grupos Hib-MenCY y Hib- MenC, comparadas con el grupo control Menjugate™ se evaluaron de 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 y Hib-MenC para el porcentaje de sujetos por encima de los límites especificados o con una respuesta de vacuna con sus IC del 95 % asintóticos estandarizados, (2) las relaciones de GMC o GMT del grupo Menjugate™ sobre los grupos Hib-MenCY y Hib-MenC con sus IC del 95 %. Las mismas comparaciones se realizaron para evaluar la diferencia entre cada par de formulaciones Hib-MenCY para los anticuerpos anti-PRP, SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY y anti-TT.

Las incidencias globales de los síntomas solicitados locales y generales se trataron por ordenador para cada grupo según el tipo de síntoma, su intensidad y relación con la vacunación (como porcentaje de sujetos que presentan síntomas solicitados generales, locales, y de cualquier tipo en los 8 días siguientes a la vacunación y su IC exacto del 95 %). Las incidencias de los síntomas no solicitados se trataron por ordenador para cada grupo para los síntomas de grado 3, con comienzo ≤ 48 horas, se proporcionó atención médica, duración, relación a la vacunación y resultados. Se describió con detalle los Casos adversos severos.

Tasas de seroprotección/seropositividad y GMC/Ts (cohorte ATP para la inmunogenicidad)

Tabla 9a Anti-PRP ($\mu\text{g/ml}$)

Grupo	N	% $\geq 0,15$	LL	UL	≥ 1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2,5/5/5	67	100,0	94,6	1100,0	98,5	92,0	100,0	9,01	7,25	11,21
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	1100,0	98,5	92,0	100,0	9,49	7,72	11,65
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	1100,0	98,6	92,3	100,0	8,08	6,53	9,98
Hib MenC	74	100,0	95,1	1100,0	98,6	92,7	100,0	10,44	8,49	12,83
Menjugate™	71	100,0	94,9	1100,0	80,3	69,1	88,8	2,60	1,97	3,43

30 Tabla 9b SBA-MenC (Títulos)

Grupo	N	% $\geq 1:8$	LL	UL	$\geq 1:128$	LL	UL	GMC	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 9c Anti-PSC ($\mu\text{g/ml}$)

Grupo	N	% $\geq 0,3$	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 9d SBA-MenY (Títulos)

Grupo	N	% ≥ 1:8	LL	UL	≥ 1:128	LL	UL	GMC	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	593,48
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 9e 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
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

5

Tabla 9e Anti-tétanos (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/títulos dentro del intervalo especificado
 GMC/T: Media geométrica de la concentración/títulos 95 % IC = Intervalo de confianza del 95 %; LL = Límite inferior; UL = Límite superior

Conclusión

Las respuestas inmunitarias contra Hib y MenC fueron superiores usando las dos formulaciones con dosis reducidas de Hib. Para MenY, se observó una respuesta SBA mejorada usando las 2,5/5/5

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena que comprende un conjugado de sacárido Hib y al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano en la que el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido más baja que está entre el 20 % y el 60 % más baja que la dosis de sacárido media de los al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano en la que los al menos dos conjugados de sacáridos bacterianos comprenden sacáridos capsulares de *N. meningitidis* derivados de cepas seleccionadas del grupo que consiste en los serogrupos A, C, W135 e Y.
2. La composición inmunógena de la reivindicación 1 en la que el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido más baja que es un 50 % más baja que la dosis de sacárido media de cada uno de los al menos dos conjugados de sacárido bacteriano.
3. La composición inmunógena de la reivindicación 1 o 2 en la que el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido más baja que la dosis de sacárido de cada uno de los al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano.
4. La composición inmunógena de la reivindicación 1 o 2 o 3 en la que los al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano comprenden el sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC).
5. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la que los al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano comprenden el sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis* (MenY).
6. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en la que los al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano comprenden el sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis* (MenA).
7. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que los al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano comprenden el sacárido capsular del serogrupo W135 de *N. meningitidis* (MenW).
8. La composición inmunógena de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la dosis de sacárido del conjugado de sacárido Hib está entre 0,1 y 9 µg, 1 y 5 µg o 2 y 3 µg de sacárido.
9. La composición inmunógena de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la dosis de sacárido de cada uno de los al menos otros dos conjugados de sacárido está entre 2 y 20 µg, 3 y 10 µg o 4 y 7 µg de sacárido.
10. La composición inmunógena de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el sacárido Hib está conjugado a una proteína portadora seleccionada del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C del TT y proteína D.
11. La composición inmunógena de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que al menos dos sacárido o sacáridos bacterianos adicionales se conjugan a una proteína portadora seleccionada del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C del TT y proteína D.
12. La composición inmunógena de la reivindicación 10 u 11 en la que la proteína portadora es TT.
13. La composición inmunógena de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que no contiene sales de aluminio o que no contiene adyuvante.
14. Una vacuna que comprende la composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. Un procedimiento de preparación de la composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende la etapa de mezcla de un conjugado de sacárido Hib con al menos otros dos conjugados de sacáridos bacterianos para formar una composición en la que el conjugado Hib está presente en una dosis de sacárido inferior que está entre el 20 % y el 60 % de la dosis de sacárido media de los al menos otros dos conjugados de sacárido bacteriano.
16. El uso de la composición inmunógena o vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para su uso en el tratamiento o la prevención de meningitis o una enfermedad causada por *Haemophilus influenzae* o una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis*.