



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 974 992**

⑫ Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑬ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2017 PCT/US2017/049856**

⑭ Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2018 WO18045286**

⑮ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2017 E 17765045 (4)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024 EP 3506935**

⑭ Título: **Vacuna contra *Neisseria meningitidis***

⑭ Prioridad:

**02.09.2016 US 201662383279 P
08.03.2017 US 201762468695 P
12.05.2017 US 201762505525 P**

⑭ Titular/es:

**SANOFI PASTEUR, INC. (100.0%)
One Discover Drive
Swiftwater, PA 18370, US**

⑭ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2024

⑭ Inventor/es:

**KENSINGER, RICHARD DAVID y
HAUSER, STEVEN L.**

⑭ Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 974 992 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

Vacuna contra *Neisseria meningitidis*

5 **I. Introducción y sumario**

Neisseria meningitidis (*N. meningitidis*) es una causa principal de meningitis bacteriana y septicemia en todo el mundo. Los serogrupos A, C, Y y W-135 de *Neisseria meningitidis* (MenA, MenC, MenY y MenW, respectivamente; colectivamente denominados MenACYW) son responsables de una parte sustancial de las enfermedades meningocócicas en todo el mundo. Actualmente existen seis tipos de vacunas para protegerse contra *N. meningitidis*, las vacunas tetravalentes de conjugado de meningococos tales como Menactra® Nimenrix® (Assaf-Casals *et al.*, Meningococcal quadrivalent tetanus toxoid conjugate vaccine (MenACWY-TT, Nimenrix™): A review of its immunogenicity, safety, co-administration, and antibody persistence. Hum Vaccin Immunother. 2016 Jul; 12(7): 1825-1837) y Mencevo® (Papaevangelou *et al.*, MenACWY-TT vaccine for active immunization against invasive meningococcal disease. Expert review of Vaccines, 11(5):523-37); vacuna de polisacárido meningocócico tal como Menomune®, vacunas meningocócicas del serogrupo C tales como Neisvac-C®, Menjugate® y Monitorix®, vacunas meningocócicas del serogrupo A tales como MenAfriVac®, vacunas meningocócicas de los serogrupos C e Y tales como MenHibrix®, y vacunas meningocócicas del serogrupo B tales como Bexsero® y Trumenba®. También se estudian vacunas de conjugado de meningococos del serogrupo X (documento WO2013114268).

20 La epidemiología de *N. meningitidis* puede describirse como compleja, impredecible, geográficamente variable y cambiante en el tiempo. Por tanto, existe una necesidad de desarrollo de vacunas mejoradas contra *N. meningitidis*. En particular, las vacunas de conjugado de polisacárido existentes pueden no ser adecuadas para su administración a uno o más de lactantes, niños pequeños, adolescentes y/o adultos mayores, o pueden provocar una serorrespuesta débil o indetectable en algunos destinatarios.

30 En algunas realizaciones, composiciones, métodos y/o usos divulgados en este documento proporcionan uno o más beneficios, o al menos proporcionan al público una elección útil. Dichos beneficios pueden incluir uno o más de inmunogenicidad mejorada contra uno, dos, tres o los cuatro de MenA, MenC, MenY y MenW; inmunogenicidad en dos, tres o cuatro de lactantes, niños pequeños, adolescentes y adultos mayores; y suficiente estabilidad para permitir almacenamiento a largo plazo como formulación líquida, por ejemplo, durante múltiples años en refrigeración (por ejemplo, 2,5, 3, 3,5, 4 o 4,5 años) o múltiples meses a temperatura ambiente (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 meses).

35 Por consiguiente, se describen las siguientes realizaciones. La realización 1 es una composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* que comprende: a) un primer conjugado de polisacárido capsular MenA con una proteína transportadora; b) un segundo conjugado de polisacárido capsular MenC con una proteína transportadora; c) un tercer conjugado de polisacárido capsular MenW-135 con una proteína transportadora; y d) un cuarto conjugado de polisacárido capsular MenY con una proteína transportadora; en donde el segundo conjugado es una población que comprende polisacáridos conjugados ligados en ambos extremos y polisacáridos conjugados ligados en un extremo, que se unen ambos a la proteína transportadora a través de una amina secundaria, y los polisacáridos del segundo conjugado tienen un nivel de O-acetilación de 0,3 µmol/mg de polisacárido a 1,6 µmol/mg de polisacárido. El nivel de O-acetilación puede ser mayor o igual a 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 o 1,2 µmol/mg de polisacárido. El nivel de O-acetilación puede ser menor o igual a 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 o 1,5 µmol/mg de polisacárido. Por ejemplo, el nivel puede variar de 0,6 a 1,5 µmol/mg de polisacárido o de 0,8 a 1,4 µmol/mg de polisacárido. El contenido de O-acetilo puede medirse por el método de Hestrin (Hestrin *et al.*, J. Biol. Chem. 1949, 180, pág. 249).

40 Los niveles de O-acetilación de polisacárido meningocócico A demostraron no tener impacto sobre la inmunogenicidad de una vacuna tetravalente de conjugado de meningococos (Lupisan *et al.*, Meningococcal Polysaccharide A O-Acetylation Levels Do Not Impact the Immunogenicity of the Quadrivalent Meningococcal Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine: Results from a Randomized, Controlled Phase III Study of Healthy Adults Aged 18 to 25 Years, Clin Vaccine Immunol. 2013 Oct; 20(10): 1499-1507).

45 La realización 2 es una composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* que comprende: a) un primer conjugado de polisacárido capsular MenA con una proteína transportadora; b) un segundo conjugado de polisacárido capsular MenC con una proteína transportadora; c) un tercer conjugado de polisacárido capsular MenW-135 con una proteína transportadora; y d) un cuarto conjugado de polisacárido capsular MenY con una proteína transportadora; en donde el segundo conjugado es una población que comprende polisacáridos conjugados ligados en un extremo que se unen a la proteína transportadora a través de una amina secundaria, en donde los polisacáridos conjugados ligados en un extremo tienen un sacárido no ligado terminal, en donde el sacárido terminal tiene un hidroxilo primario o enlace amina secundaria en la posición 7, o en donde el extremo reductor se modifica con un enlace (2-hidroxi)etoxi o amina secundaria. La población de segundo conjugado puede comprender además conjugados ligados en ambos extremos que tienen proteínas transportadoras ligadas a ambos extremos del polisacárido, por ejemplo, a través de una amina secundaria.

50 65 La realización 3 es una composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* que comprende: a) un primer conjugado de polisacárido capsular MenA con una proteína transportadora; b) un segundo conjugado de polisacárido capsular

- MenC con una proteína transportadora; c) un tercer conjugado de polisacárido capsular MenW-135 con una proteína transportadora; y d) un cuarto conjugado de polisacárido capsular MenY con una proteína transportadora; en donde el polisacárido capsular MenA se une a la proteína transportadora a través de un conector que comprende un carbamato, un espaciador y una amida, en donde el espaciador está entre el carbamato y la amida y comprende 2-10 carbonos lineales, y el primer conjugado tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,3 a 1,5. El primer conjugado puede tener una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de, por ejemplo, 0,3 a 0,4, 0,4 a 0,5, 0,5 a 0,6, 0,6 a 0,7, 0,7 a 0,8, 0,8 a 0,9, 0,9 a 1,0, 1,0 a 1,1, 1,1 a 1,2, 1,2 a 1,3, 1,3 a 1,4, o 1,4 a 1,5.
- 10 La realización 4 es una composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* que comprende: a) un primer conjugado de polisacárido capsular MenA con una proteína transportadora; b) un segundo conjugado de polisacárido capsular MenC con una proteína transportadora; c) un tercer conjugado de polisacárido capsular MenW-135 con una proteína transportadora; y d) un cuarto conjugado de polisacárido capsular MenY con una proteína transportadora; en donde el polisacárido capsular MenA se une a la proteína transportadora a través de un conector que comprende un carbamato, un espaciador y una amida, en donde el espaciador está entre el carbamato y la amida y comprende 2-10 carbonos lineales; y en donde los polisacáridos capsulares MenC, MenW-135 y MenY se unen a la proteína transportadora a través de una amina secundaria; y al menos uno de los conjugados tiene un peso molecular promedio en peso que varía de 300 kDa a 1500 kDa.
- 15 20 La realización 5 es una composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* que comprende: a) un primer conjugado de polisacárido capsular MenA con una proteína transportadora; b) un segundo conjugado de polisacárido capsular MenC con una proteína transportadora; c) un tercer conjugado de polisacárido capsular MenW-135 con una proteína transportadora; y d) un cuarto conjugado de polisacárido capsular MenY con una proteína transportadora; en donde la proteína transportadora es toxoide tetánico; uno o más del primer, segundo, tercero y cuarto conjugados tiene un peso molecular promedio en peso que varía de 300 kDa a 1500 kDa; y la composición comprende menos de un 20 % de polisacárido libres en peso con respecto al polisacárido total. Al menos uno, dos, tres o cuatro de los conjugados en la composición pueden tener un peso molecular promedio en peso que varía de 300 kDa a 1500 kDa. El peso molecular promedio en peso de al menos uno, dos, tres o cuatro de los conjugados en la composición puede ser mayor de o igual a 400 kDa, 500 kDa, 600 kDa, 700 kDa, 800 kDa, 900 kDa, 1000 kDa o 1100 kDa. El peso molecular promedio en peso de al menos uno, dos, tres o cuatro de los conjugados en la composición puede ser menor de o igual a 600 kDa, 700 kDa, 800 kDa, 900 kDa, 1000 kDa, 1100 kDa, 1200 kDa, 1300 kDa o 1400 kDa. Al menos un conjugado puede tener un peso molecular en el intervalo de 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400 o 1400-1500 kDa. El conjugado MenA puede tener un peso molecular en el intervalo de 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400 o 1400-1500 kDa. El conjugado MenC puede tener un peso molecular en el intervalo de 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400 o 1400-1500 kDa. El conjugado MenY puede tener un peso molecular en el intervalo de 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400 o 1400-1500 kDa. El conjugado MenW-135 puede tener un peso molecular en el intervalo de 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400 o 1400-1500 kDa.
- 30 35 40 La realización 6 es una composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* que comprende: a) un primer conjugado de polisacárido capsular MenA con una proteína transportadora; b) un segundo conjugado de polisacárido capsular MenC con una proteína transportadora; c) un tercer conjugado de polisacárido capsular MenW-135 con una proteína transportadora; y d) un cuarto conjugado de polisacárido capsular MenY con una proteína transportadora; en donde la proteína transportadora es toxoide tetánico; uno o más del primer, segundo, tercero y cuarto conjugados tienen una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,3 a 1,5; y la composición comprende menos de un 20 % de polisacárido libres en peso con respecto al polisacárido total. El primer conjugado puede tener una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de, por ejemplo, 0,3 a 0,4, 0,4 a 0,5, 0,5 a 0,6, 0,6 a 0,7, 0,7 a 0,8, 0,8 a 0,9, 0,9 a 1,0, 1,0 a 1,1, 1,1 a 1,2, 1,2 a 1,3, 1,3 a 1,4, o 1,4 a 1,5. El segundo conjugado puede tener una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de, por ejemplo, 0,3 a 0,4, 0,4 a 0,5, 0,5 a 0,6, 0,6 a 0,7, 0,7 a 0,8, 0,8 a 0,9, 0,9 a 1,0, 1,0 a 1,1, 1,1 a 1,2, 1,2 a 1,3, 1,3 a 1,4, o 1,4 a 1,5. El tercero conjugado puede tener una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de, por ejemplo, 0,3 a 0,4, 0,4 a 0,5, 0,5 a 0,6, 0,6 a 0,7, 0,7 a 0,8, 0,8 a 0,9, 0,9 a 1,0, 1,0 a 1,1, 1,1 a 1,2, 1,2 a 1,3, 1,3 a 1,4, o 1,4 a 1,5. El cuarto conjugado puede tener una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de, por ejemplo, 0,3 a 0,4, 0,4 a 0,5, 0,5 a 0,6, 0,6 a 0,7, 0,7 a 0,8, 0,8 a 0,9, 0,9 a 1,0, 1,0 a 1,1, 1,1 a 1,2, 1,2 a 1,3, 1,3 a 1,4, o 1,4 a 1,5.
- 45 50 55 La realización 7 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el primer, segundo, tercero y/o cuarto conjugados son una población que comprende moléculas con un peso molecular en el intervalo de 700 kDa a 1400 kDa o de 800 kDa a 1300 kDa. El primer y segundo conjugados pueden ser una población que comprende moléculas con un peso molecular en el intervalo de 700 kDa a 1400 kDa o de 800 kDa a 1300 kDa. El primer y tercero conjugados pueden ser una población que comprende moléculas con un peso molecular en el intervalo de 700 kDa a 1400 kDa o de 800 kDa a 1300 kDa. El primer y cuarto conjugados pueden ser una población que comprende moléculas con un peso molecular en el intervalo de 700 kDa a 1400 kDa o de 800 kDa a 1300 kDa. El segundo y tercero conjugados pueden ser una población que comprende moléculas con un peso molecular en el intervalo de 700 kDa a 1400 kDa o de 800 kDa a 1300 kDa. El segundo y cuarto conjugados pueden ser una población que comprende moléculas con un peso molecular en el intervalo de 700 kDa a 1400 kDa o de 800 kDa a 1300 kDa.
- 60 65

El tercer y cuarto conjugados pueden ser una población que comprende moléculas con un peso molecular en el intervalo de 700 kDa a 1400 kDa o de 800 kDa a 1300 kDa.

- 5 La realización 8 es una composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* que comprende un conjugado de polisacárido capsular MenC con una proteína transportadora, en donde el conjugado es una población que comprende polisacáridos conjugados ligados en ambos extremos y polisacáridos conjugados ligados en un extremo, que ambos se unen a la proteína transportadora a través de una amina secundaria, y los polisacáridos del conjugado de polisacárido capsular MenC con la proteína transportadora tienen un nivel de O-acetilación que tiene de 0,3 μ mol/mg de polisacárido a 1,6 μ mol/mg de polisacárido. El nivel de O-acetilación puede ser mayor de o igual a 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 o 1,2 μ mol/mg de polisacárido. El nivel de O-acetilación puede ser menor de o igual a 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 o 1,5 μ mol/mg de polisacárido. Por ejemplo, el nivel puede variar de 0,6 a 1,5 μ mol/mg de polisacárido o de 0,8 a 1,4 μ mol/mg de polisacárido. El contenido de O-acetilo puede medirse por el método de Hestrin (Hestrin *et al.*, J. Biol. Chem. 1949, 180, pág. 249).
- 10 15 La realización 9 es la composición de vacuna de la realización 8, en donde el conjugado (a) tiene un peso molecular promedio en peso que varía de 300 kDa a 1500 kDa; o (b) es una población que comprende moléculas que tienen un peso molecular en el intervalo de 700 kDa a 1400 kDa o de 800 kDa a 1300 kDa.
- 15 20 La realización 10 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 4, 5, 7 o 9, en donde el peso molecular se determina por dispersión de luz de múltiple ángulo (MALS).
- 20 25 La realización 11 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el polisacárido MenC tiene un grado de O-acetilación que varía de 0,6 a 1,5 μ mol/mg de polisacárido o de 0,8 a 1,4 μ mol/mg de polisacárido.
- 25 30 La realización 12 es la composición de vacuna de la realización 11, en donde el grado de O-acetilación es mayor de o igual a 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 o 1,2 μ mol/mg de polisacárido.
- 30 35 La realización 13 es la composición de vacuna de la realización 11, en donde el grado de O-acetilación es menor de o igual a 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3 o 1,4 μ mol/mg de polisacárido.
- 35 40 La realización 14 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones, en donde el conjugado que comprende polisacárido MenC es una población que comprende polisacáridos conjugados ligados en ambos extremos y polisacáridos conjugados ligados en un extremo.
- 40 45 La realización 15 es la composición de vacuna de la realización 14, en donde los polisacáridos ligados en un extremo del segundo conjugado comprenden un sacárido no ligado terminal, en donde los polisacáridos conjugados ligados en un extremo tienen un sacárido no ligado terminal, en donde el sacárido terminal tiene un hidroxilo primario en la posición 7, o en donde el extremo reductor está modificado con un (2-hidroxietoxi).
- 45 50 La realización 16 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el conjugado que comprende polisacárido MenC comprende una o más modificaciones elegidas de (i) un hidroxilo primario en la posición 7, (ii) un (2-hidroxietoxi) en el extremo reductor, y (iii) una conjugación con la proteína transportadora, en donde las modificaciones están presentes a no menos de 25 nmol/mg de polisacárido.
- 50 55 La realización 17 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, que comprende un conjugado de polisacárido MenW-135 y/o MenY, que comprende una o más modificaciones elegidas de (i) un hidroxilo primario en una posición de un diol vecinal en un polisacárido MenW-135 o MenY natural y (ii) una conjugación con la proteína transportadora, en donde las modificaciones están presentes a no menos de 60 nmol/mg de polisacárido.
- 55 60 La realización 18 es la composición de vacuna de la realización 16 o 17, en donde las modificaciones están presentes en una cantidad menor de 200 nmol/mg de polisacárido, menor de 150 nmol/mg de polisacárido, menor de 150 nmol/mg de polisacárido, menor de 100 nmol/mg de polisacárido o menor de 80 nmol/mg de polisacárido.
- 60 65 La realización 19 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el polisacárido MenC está reducido en tamaño en 3x-8x con respecto al polisacárido MenC natural.
- 65 70 La realización 20 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, que comprende un conjugado de polisacárido capsular MenA con una proteína transportadora que tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,5 a 1,5. La realización 20A es la composición de vacuna de la realización 20, que comprende un conjugado de polisacárido capsular MenA con una proteína transportadora que tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,7 a 1,4.
- 70 75 La realización 21 es la composición de vacuna de la realización 20, en donde el conjugado MenA tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,8 a 1,3.

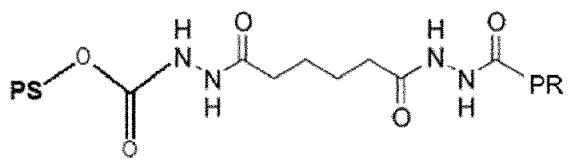
La realización 22 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, que comprende un conjugado de polisacárido capsular MenC y/o MenY con una proteína transportadora que tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,3 a 1,1.

- 5 La realización 23 es la composición de vacuna de la realización 22, en donde el conjugado MenC tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,4 a 0,8.
- 10 La realización 24 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, que comprende un conjugado de polisacárido capsular MenW-135 con una proteína transportadora que tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,3 a 1,3.
- 15 La realización 25 es la composición de vacuna de la realización 24, en donde el conjugado MenW-135 tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,6 a 1,3.
- 20 La realización 26 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, que comprende un conjugado de polisacárido capsular MenY con una proteína transportadora que tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,5 a 1,3.
- 25 La realización 28 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde la composición comprende menos de un 20 % de polisacárido libre en peso.
- 30 La realización 29 es la composición de vacuna de la realización 28, en donde la composición comprende menos de un 10 % de polisacárido libre en peso, menos de un 5 % de polisacárido libre en peso, o sustancialmente carece de polisacárido libre.
- 35 La realización 30 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el polisacárido del conjugado MenA, MenC, MenW-135 o MenY se une a la proteína transportadora a través de un conector.
- 40 La realización 31 es la composición de vacuna de la realización 30, en donde el conector comprende 2-10 carbonos lineales.
- 45 La realización 32 es la composición de vacuna de las realizaciones 30 y 31, en donde el conector está presente en el conjugado MenA, MenC, MenW-135 o MenY a una relación de un conector por 10-100 unidades repetitivas de sacárido.
- 50 La realización 33 es la composición de vacuna de las realizaciones 30 y 31, en donde el conector está presente en el conjugado MenA, MenC, MenW-135 o MenY a una relación de un conector por 20-60 unidades repetitivas de sacárido.
- 55 La realización 34 es la composición de vacuna de las realizaciones 30 y 31, en donde el conector comprende un espaciador entre un primer carbonilo y un segundo carbonilo, y el espaciador comprende 4-8 carbonos.

La realización 35 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 30-34, en donde el conector del conjugado MenA comprende un residuo de una dihidrazida.

La realización 36 es la composición de vacuna de la realización 35, en donde el conector del conjugado MenA comprende un residuo de dihidrazida de ácido adípico.

La realización 37 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el polisacárido del conjugado MenA, MenC, MenW-135 y/o MenY se une a la proteína transportadora a través de un conector de fórmula I:



(I)

en donde PS indica la unión al polisacárido y PR indica la unión a la proteína transportadora.

- La realización 38 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 30-37, en donde el conector está en el conjugado MenA.
- 5 La realización 39 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 30-37, en donde el conector está en el conjugado MenC.
- La realización 40 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 30-37, en donde el conector está en el conjugado MenW-135.
- 10 La realización 41 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 30-37, en donde el conector está en el conjugado MenY.
- La realización 42 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el polisacárido del conjugado MenA, MenC, MenW-135 y/o MenY se une a la proteína transportadora como se muestra en la fórmula II: PR-NH-CH₂-PS (II) en donde PS indica la unión al polisacárido y PR indica la unión a la proteína transportadora.
- 15 La realización 43 es la composición de vacuna de la realización 42, en donde el polisacárido del conjugado MenA se une a la proteína transportadora como se muestra en la fórmula II.
- 20 La realización 44 es la composición de vacuna de la realización 42, en donde el polisacárido del conjugado MenC se une a la proteína transportadora como se muestra en la fórmula II.
- 25 La realización 45 es la composición de vacuna de la realización 42, en donde el polisacárido del conjugado MenW-135 se une a la proteína transportadora como se muestra en la fórmula II.
- La realización 46 es la composición de vacuna de la realización 42, en donde el polisacárido del conjugado MenY se une a la proteína transportadora como se muestra en la fórmula II.
- 30 La realización 47 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde la proteína transportadora comprende o consiste en exoproteína A recombinante (rEPA), toxoide diftérico o un fragmento B de toxina diftérica, CRM197, toxoide tetánico o un fragmento C de toxina tetánica.
- 35 La realización 48 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde la proteína transportadora es toxoide tetánico.
- La realización 49 es un método de producción de un conjugado de un polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* con una proteína transportadora, que comprende: a) activar el polisacárido con un agente de activación que puede formar un enlace carbamato, en donde el agente activador está presente en un exceso molar sobre el polisacárido de 40 veces a 50 veces; b) inactivar parcialmente el polisacárido activado y derivatizar el polisacárido activado con un conector de dihidrazida añadido a una relación molar de 0,3 a 1,0 con respecto a las unidades repetitivas de polisacárido, en donde el polisacárido se derivatiza a una relación de un conector de dihidrazida por 10-100 unidades repetitivas de sacárido; c) conjugar el polisacárido derivatizado con la proteína transportadora mediante química de carbodiimida, en donde el polisacárido está presente al inicio de la reacción de conjugación a una relación ponderal de 3:1 a 5:1 con respecto a la proteína transportadora, formando de ese modo el conjugado.
- 45 La realización 50 es el método de la realización 49, en donde el conector de dihidrazida se añade a una relación molar de 0,4 a 0,6 con respecto a las unidades repetitivas de polisacárido.
- 50 La realización 51 es el método de la realización 49, que comprende una etapa adicional de inactivar la reacción con glicerol.
- La realización 52 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 51, en donde el conector de dihidrazida es dihidrazida de ácido adípico.
- 55 La realización 53 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 51, en donde el polisacárido derivatizado está a una concentración de partida de 10 g/l a 20 g/l en la reacción de conjugación.
- 60 La realización 54 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 51, en donde el agente activador comprende un carbonilo unido a dos heteroarilos N-ligados tales como CDI (1,1'-carbonildiimidazol) y CDT (1,1'-carbonil-di-(1,2,4-triazol)), u otros grupos salientes apropiados.
- La realización 55 es el método de la realización 54, en donde el agente activador es carbonildiimidazol.
- 65 La realización 56 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 51, en donde el agente activador está presente en la etapa de activación en un exceso molar sobre el polisacárido de 35 veces a 45 veces.

La realización 57 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 51, en donde la etapa de conjugación comprende hacer reaccionar la proteína transportadora con N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

5 La realización 58 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 51, en donde el polisacárido es polisacárido capsular MenA.

10 La realización 59 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 51, en donde el polisacárido es polisacárido capsular MenC.

15 La realización 60 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 51, en donde el polisacárido es polisacárido capsular MenW-135 o MenY.

20 La realización 61 es un método de producción de un conjugado de un polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* con una proteína transportadora, que comprende: a) des-O-acetilar parcialmente el polisacárido mediante hidrólisis alcalina; b) activar el polisacárido mediante tratamiento con peryodato, convirtiendo de ese modo los dioles en aldehídos hasta un grado de al menos 20 nmol de aldehído por mg de polisacárido; c) conjugar el polisacárido activado con la proteína transportadora mediante aminación reductora, en donde el polisacárido está presente en la reacción de conjugación a una relación ponderal de 1:1 a 5:1 con respecto a la proteína transportadora, formando de ese modo el conjugado.

25 La realización 62 es el método de la realización 61, en donde el polisacárido está presente en la reacción de conjugación a una relación ponderal de 1,5 a 3:1 con respecto a la proteína transportadora.

30 La realización 63 es el método de la realización 61, en donde la des-O-acetilación reduce la cantidad inicial de O-acetilación en el polisacárido en un 40 % a un 70 %, o en un 50 % a un 60 %.

35 La realización 64 es el método de una cualquiera de las realizaciones 61 a 63, en donde después de la des-O-acetilación, el polisacárido tiene un grado de O-acetilación de 0,6 μ mol/mg de polisacárido a 1,5 μ mol/mg de polisacárido o de 0,8 a 1,4 μ mol/mg de polisacárido.

40 La realización 65 es el método de la realización 64, en donde el grado de O-acetilación es mayor de o igual a 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 o 1,2 μ mol/mg de polisacárido.

45 La realización 66 es el método de la realización 64, en donde el grado de O-acetilación es menor de o igual a 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3 o 1,4 μ mol/mg de polisacárido.

50 La realización 67 es el método de una cualquiera de las realizaciones 61 a 66, en donde el polisacárido activado está a una concentración de partida de 20 g/l a 50 g/l en la reacción de conjugación.

55 La realización 68 es el método de una cualquiera de las realizaciones 61 a 66, en donde el polisacárido es polisacárido capsular MenC.

60 La realización 69 es el método de una cualquiera de las realizaciones 61 a 66, en donde el polisacárido es polisacárido capsular MenA.

65 La realización 70 es el método de una cualquiera de las realizaciones 61 a 66, en donde el polisacárido es polisacárido capsular MenW-135 o MenY.

70 La realización 71 es el método de una cualquiera de las realizaciones 61 a 66, en donde el polisacárido se reduce en tamaño hasta 30 a 150 kDa o hasta 50 a 100 kDa antes de la reacción de conjugación.

75 La realización 72 es un método de producción de un conjugado de un polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* con una proteína transportadora, que comprende: a) activar el polisacárido mediante tratamiento con peryodato, convirtiendo de ese modo los dioles en aldehídos hasta un grado de al menos 50 nmol de aldehído por mg de polisacárido; b) conjugar el polisacárido activado con la proteína transportadora mediante aminación reductora, en donde el polisacárido está presente en la reacción de conjugación a una relación ponderal de 1:1 a 5:1 con respecto a la proteína transportadora, formando de ese modo el conjugado.

80 La realización 73 es el método de la realización 72, en donde el polisacárido está presente en la reacción de conjugación a una relación ponderal de 1,5 a 3:1 con respecto a la proteína transportadora.

85 La realización 74 es el método de una cualquiera de las realizaciones 72 y 73, en donde el polisacárido es polisacárido capsular MenW-135 o MenY.

- La realización 75 es el método de una cualquiera de las realizaciones 72 y 73, en donde el polisacárido es polisacárido capsular MenC.
- 5 La realización 76 es el método de una cualquiera de las realizaciones 72 y 73, en donde el polisacárido es polisacárido capsular MenA.
- La realización 77 es el método de una cualquiera de las realizaciones 72 a 76, en donde el polisacárido se reduce en tamaño hasta 100 a 200 kDa o hasta 125 a 175 kDa antes de la reacción de conjugación.
- 10 La realización 78 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49, 61 y 72, en donde el polisacárido se reduce en tamaño mediante hidrólisis ácida y/o calor.
- La realización 79 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49, 61 y 72, en donde el polisacárido se reduce en tamaño mediante escisión oxidativa.
- 15 La realización 80 es el método de una cualquiera de las realizaciones 72 a 79, en donde la aminación reductora comprende reducir iminas en aminas usando un cianoborohidruro, u otros reactivos reductores tales como piridinaborano (C_5H_8BN) y complejo de picolinaborano ($C_6H_7N \cdot BH_3$).
- 20 La realización 81 es el método de una cualquiera de las realizaciones 72 a 79, que comprende además convertir aldehídos sin reaccionar en el conjugado en alcoholes con un agente reductor.
- La realización 82 es el método de la realización 81, en donde el reactivo reductor es un borohidruro.
- 25 La realización 83 es el método de una cualquiera de las realizaciones 72 a 79, en donde se añade peryodato a una concentración de 1 mM a 4 mM o de 1,5 mM a 3 mM para activar el polisacárido.
- La realización 84 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 83, que comprende además purificar el conjugado mediante cromatografía de interacción hidrófoba.
- 30 La realización 85 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 83, que comprende además purificar el conjugado mediante cromatografía en resina en modo mixto.
- La realización 86 es un método de purificación de un conjugado de un polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* con una proteína transportadora a partir de una mezcla que contiene el conjugado, una sal y polisacárido libre, que comprende: a) poner en contacto una resina de cromatografía de interacción hidrófoba con la mezcla, en donde el conjugado se une a la resina; b) eluir el polisacárido libre de la resina; y c) eluir el conjugado de la resina con un líquido acuoso, en donde el líquido acuoso está libre de sal o contiene menos sal que la mezcla, obteniendo de ese modo una composición que comprende conjugado purificado.
- 40 La realización 87 es el método de la realización 86, en donde la sal comprende sulfato de amonio.
- La realización 88 es el método de la realización 86 o realización 87, en donde la mezcla comprende sal en una cantidad que varía de 0,5 a 1,5 M o de 0,8 a 1,2 M.
- 45 La realización 89 es el método de una cualquiera de las realizaciones 86 a 88, en donde el líquido acuoso comprende menos de 0,2, 0,1 o 0,05 M de sal.
- La realización 90 es el método de una cualquiera de las realizaciones 86 a 89, en donde el líquido acuoso es agua.
- 50 La realización 91 es el método de una cualquiera de las realizaciones 86 a 90, en donde la composición comprende menos de un 20 % de polisacárido libre en peso, menos de un 10 % de polisacárido libre en peso, menos de un 5 % de polisacárido libre en peso, o sustancialmente carece de polisacárido libre.
- 55 La realización 92 es el método de una cualquiera de las realizaciones 86 a 91, en donde la resina de cromatografía de interacción hidrófoba es una resina de fenilo, propilo o butilo.
- La realización 93 es el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 92, en donde la proteína transportadora es toxoide tetánico.
- 60 La realización 94 es un conjugado producido de acuerdo con el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 85.
- La realización 95 es una composición de vacuna que comprende: a) un primer conjugado de polisacárido capsular MenA con una proteína transportadora; b) un segundo conjugado de polisacárido capsular MenC con una proteína transportadora; c) un tercer conjugado de polisacárido capsular MenW-135 con una proteína transportadora; y d) un

cuarto conjugado de polisacárido capsular MenY con una proteína transportadora; en donde uno, dos, tres o todos del primer, segundo, tercer y cuarto conjugados se produjeron de acuerdo con el método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 85.

5 La realización 96 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 1-48 o 95, que está libre de adyuvante.

La realización 97 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 1-48 o 95-96, que comprende además un tampón farmacéuticamente aceptable.

10 La realización 98 es la composición de vacuna de la realización 97, que comprende tampón acetato con un pH de 5,5 a 6,5.

15 La realización 99 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 1-48 o 95-98, que comprende además una sal farmacéuticamente aceptable.

20 La realización 100 es la composición de vacuna de la realización 99, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio.

25 La realización 101 es la composición de vacuna de la realización 99 o 100, en donde la sal farmacéuticamente aceptable está presente a un 0,45 % hasta un 0,9 % p/v, o a un 0,5 % p/v hasta un 0,85 % p/v.

La realización 102 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 1-48 o 95-101, en donde al menos uno, dos, tres o los cuatro del primer, segundo, tercero y cuarto conjugados comprenden múltiples puntos de unión entre los polisacáridos y las proteínas transportadoras.

30 La realización 103 es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 1-48 o 95-102, formulada para administración intramuscular.

35 La realización 104 es una dosis unitaria individual de la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 1-48 o 9495-103, que comprende de 6 µg a 15 µg de cada uno de los polisacáridos MenA, MenC, MenW-135 y MenY.

La realización 105 es la dosis unitaria individual de la realización 104, en donde la proteína transportadora está presente en una cantidad de aproximadamente 50 µg a 80 µg.

40 La realización 106 es la dosis unitaria individual de la realización 104 o 105, que está contenida en una jeringa.

La realización 107 es la dosis unitaria individual de la realización 106, en donde la jeringa está libre de silicona.

45 La realización 108 es la dosis unitaria individual de la realización 106 o 107, en donde la jeringa está envasada para venta o distribución comercial.

La realización 109 es un método de vacunación de un sujeto contra *Neisseria meningitidis*, que comprende administrar una dosis de la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 1-48 o 95-103 al sujeto. La realización 109A es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 1-48 o 95-103 para su uso en un método de vacunación de un sujeto contra *Neisseria meningitidis*, que comprende administrar una dosis de la composición de vacuna al sujeto.

50 La realización 110 es el uso de la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 1-48 o 95-103 o la dosis unitaria individual de una cualquiera de las realizaciones 104-108 para inmunizar a un sujeto contra *Neisseria meningitidis*. La realización 110A es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 1-48 o 95-103 o la dosis unitaria individual de una cualquiera de las realizaciones 104-108 para su uso en inmunización de un sujeto contra *Neisseria meningitidis*.

55 La realización 111 es el uso de la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 1-48 o 95-103 o la dosis unitaria individual de una cualquiera de las realizaciones 104-108 para la preparación de un medicamento para inmunizar a un sujeto contra *Neisseria meningitidis*. La realización 111A es la composición de vacuna de una cualquiera de las realizaciones 1-48 o 95-103 o la dosis unitaria individual de una cualquiera de las realizaciones 104-108 para su uso como medicamento para inmunizar a un sujeto contra *Neisseria meningitidis*.

60 La realización 112 es el método, uso o composición de una cualquiera de las realizaciones 109-111A, en donde la vacuna se administra por vía intramuscular.

65 La realización 113 es el método, uso o composición de una cualquiera de las realizaciones 109-112, en donde el sujeto es de 6 semanas a 3 años de edad.

La realización 114 es el método, uso o composición de la realización 113, en donde el sujeto es de 2 meses, 6 meses, 12 meses o 15 meses de edad.

5 La realización 115 es el método, uso o composición de una cualquiera de las realizaciones 109-112, en donde el sujeto es de 50 años o más, 55 años o más, 60 años o más, o 65 años o más de edad.

La realización 116 es el método, uso o composición de cualquiera de las realizaciones 109-115, en donde la vacuna se administra como una dosis de 0,5 ml.

10 La realización 117 es el método, uso o composición de la realización 116, en donde la vacuna comprende 4-10 µg de cada uno de los serogrupos A, C, Y y W-135.

La realización 118 es el método, uso o composición de la realización 116, en donde la vacuna comprende 50-80 µg de proteína toxoide tetánica.

15 La realización 119 es el método, uso o composición de la realización 116, en donde la vacuna comprende 4-10 µg de cada uno de los serogrupos A, C, Y y W-135, y 50-80 µg de proteína toxoide tetánica.

20 La realización 120 es el método, uso o composición de cualquiera de las realizaciones 109-119, que comprende además administrar una vacuna que no está dirigida contra *Neisseria meningitidis* al mismo tiempo que, pero no en la misma inyección que, la vacuna de MenACYW-TT.

25 La realización 121 es el método, uso o composición de la realización 120, en donde la vacuna que no es contra *Neisseria meningitidis* está dirigida a prevenir infecciones de varicela, difteria, Hib, hepatitis b, sarampión, paperas, tosferina, poliomielitis, neumococos, rotavirus, rubéola o tétanos.

La realización 122 es el método, uso o composición de la realización 120, en donde la vacuna que no es contra *Neisseria meningitidis* es DTaP5, Hib, HepB, DTaP5-IPV/Hib, DTaP5-IPV/Hib, HepB, MMR, IPV, PCV7, PCV13, RV1 o RV5.

30 La realización 123 es el método, uso o composición de una cualquiera de las realizaciones 109-122, en donde el sujeto recibió previamente una vacuna de conjugado de sacárido capsular de *Neisseria meningitidis*.

35 La realización 124 es el método, uso o composición de la realización 123, en donde el sujeto recibió la vacuna de conjugado de sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* de cuatro meses a diez años antes. La realización 124A es el método, uso o composición de la realización 123, en donde el sujeto recibió la vacuna de conjugado de sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* de dos meses a diez años antes.

40 La realización 125 es el método, uso o composición de una cualquiera de las realizaciones 109-122, en donde el sujeto no recibió previamente una vacuna de conjugado de sacárido capsular de *Neisseria meningitidis*.

La invención se expone como se define en el conjunto de reivindicaciones.

II. Breve descripción de las figuras

45 La **figura 1A** muestra un esquema de un conjugado de polisacárido de serogrupo A-proteína ligada mediante ADH. Se formaron polisacáridos de serogrupo A **10** con residuos de sitio reactivo **11** por activación con carbonildiimidazol (CDI) y opcionalmente derivatización con dihidrazida de ácido adipico (ADH) en grupos hidroxilo del polisacárido y reacción con una proteína (por ejemplo, toxoide tetánico (TT)). El polisacárido activado/derivatizado se reticula con la proteína **13** a través de un enlace **12** directa o indirectamente en los grupos **14**. Por ejemplo, enlaces directos pueden usarse aminas primarias de la proteína, por ejemplo, formando un enlace carbamato (por ejemplo, derivado de CDI). Enlaces indirectos pueden derivar de ADH y *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)carbodiímidida (EDAC), que activa los carboxilos de la proteína.

55 La **figura 1B** ilustra la preparación de un intermedio activo de *O*-acilisourea de una proteína transportadora (por ejemplo, TT) usando *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)carbodiímidida (EDAC), que reacciona con grupos carboxilo (por ejemplo, en cadenas laterales de ácido aspártico o ácido glutámico, o el extremo C) de la proteína. Este intermedio es adecuado para acoplamiento a grupos amina de un polisacárido derivatizado activado (no mostrado).

60 La **figura 1C** ilustra un esquema general para producir polisacárido de serogrupo A derivatizado activado, que puede usarse para producir un conjugado de polisacárido de serogrupo A-ADH ligado a una proteína transportadora (por ejemplo, TT). En esta realización, los polisacáridos se activan en grupos hidroxilo con CDI, formando un intermedio activo de carbamato de imidazol, que se derivatiza adicionalmente con ADH. El polisacárido de serogrupo A derivatizado con ADH es adecuado para unión covalente a la proteína

transportadora mediante acoplamiento de amina de los grupos amina primaria en el conector de ADH a un intermedio activo de O-acilisourea de la proteína transportadora (no mostrada).

5 La **figura 1D** muestra un esquema general para producir un conjugado de polisacárido de serogrupo A ligado a toxoide tetánico mediante un carbamato. Los polisacáridos (PS) se activan en los grupos hidroxilo con CDI, formando un intermedio activo de carbamato de imidazol. El intermedio activo entonces se hace reaccionar con un vehículo proteinico (PR). Se forma un enlace carbamato a través de una reacción de sustitución nucleófila en que una amina primaria de la proteína ataca el carbono de carbamato, provocando pérdida de imidazol y formación de un enlace carbamato entre el polisacárido y la proteína.

10 10 Las **figuras 1E-F** muestran la estructura de un polisacárido de serogrupo A (E) después de activación con CDI y (F) después de activación con CDI y derivatización con ADH.

15 15 La **figura 1G** ilustra la producción de un conjugado de polisacárido de serogrupo A-ADH ligado a una proteína transportadora (por ejemplo, TT) a partir de polisacárido derivatizado activado y un intermedio activo de O-acilisourea formado a partir de proteína transportadora toxoide tetánico y *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). La amina primaria del polisacárido derivatizado activado sustituye la isourea, que sirve como grupo saliente, dando un producto en que la proteína se liga al polisacárido a través de un enlace amida, el residuo de ADH y un enlace carbamato, en que el carbonilo derivado de CDI. No se muestra el subproducto de urea eliminado.

20 20 La **figura 1H** muestra el producto de la reacción de la figura 1F con la estructura de la unidad repetitiva de polisacárido ligada (incluyendo el residuo de ADH) extendida.

25 La **figura 2A** muestra un esquema de un conjugado de polisacárido de serogrupo C-proteína. Los polisacáridos de serogrupo C **20** se unen a una proteína (por ejemplo, toxoide tetánico) **21** en sus extremos.

30 30 La **figura 2B** ilustra la activación de polisacárido de serogrupo C (mostrado con numeración convencional de los carbonos en la unidad repetitiva de polisacárido) usando metaperyodato de sodio. El tratamiento con metaperyodato de sodio provoca la escisión entre los carbonos 7 y 8, lo que despolimeriza oxidativamente el polisacárido en los aldehídos terminales correspondientes.

35 35 La **figura 2C** ilustra la formación de un conjugado de polisacárido de serogrupo C-proteína (por ejemplo, TT) mediante aminación reductora. Una amina primaria de la proteína (PR) (por ejemplo, cadena lateral de lisina o extremo N) reacciona con un aldehído terminal de un polisacárido de serogrupo C activado, despolimerizado (PS) para formar un intermedio de base de Schiff (no mostrado), que se reduce (por ejemplo, usando piridinaborano, picolinaborano o un cianoborohidruro) para dar un enlace de amina secundaria. El resto de polisacárido se liga en el extremo a la proteína. Las moléculas de proteína individuales pueden reaccionar con más de un polisacárido y algunos extremos de polisacárido pueden estar sin reaccionar (no mostrado; véase la ilustración en la figura 2A). Los aldehídos sin reaccionar se pueden cubrir, es decir, reducirse a alcoholes, usando un agente reductor adecuado tal como borohidruro de sodio después de la reducción de la base de Schiff (no mostrada).

40 40 La **figura 2D** muestra el producto de la reacción de la figura 2C con la estructura de la unidad repetitiva de polisacárido ligada extendida. Es posible el enlace de la proteína a polisacáridos adicionales (no mostrado).

45 La **figura 3** muestra un esquema de un conjugado de polisacárido de serogrupo W-135 o serogrupo Y-proteína. Los polisacáridos de serogrupo W-135 o serogrupo Y **31** se unen a una o más proteínas (por ejemplo, toxoide tetánico) **30** en una o más posiciones.

50 50 La **figura 4A** ilustra la despolimerización y activación de polisacárido de serogrupo W-135. El polisacárido se despolimeriza usando, por ejemplo, temperatura elevada y después se activa por tratamiento con metaperyodato de sodio, que escinde los dioles vecinales tales como, por ejemplo, entre el carbono 7 y 8 del resto de ácido siálico y los oxida en aldehídos.

55 55 La **figura 4B** ilustra la formación de un conjugado de polisacárido de serogrupo W-135-proteína (por ejemplo, TT) mediante aminación reductora. Una amina primaria de la proteína (PR) (por ejemplo, cadena lateral de lisina o extremo N) reacciona con un aldehído de un polisacárido de serogrupo W-135 activado, despolimerizado (PS) para formar un intermedio de base de Schiff (no mostrado). El intermedio se reduce mediante cianoborohidruro de sodio para dar un enlace de amina secundaria. Las moléculas de proteína individuales pueden reaccionar con más de un polisacárido y viceversa (no mostrado; véase la ilustración en la figura 3). Los aldehídos sin reaccionar se pueden cubrir, es decir, reducirse a alcoholes, usando un agente reductor adecuado tal como borohidruro de sodio después de la reducción de la base de Schiff (no mostrada).

La **figura 4C** muestra un producto de la reacción de la figura 4B con una posible estructura de la unidad repetitiva de polisacárido ligada extendida. Es posible el enlace de la proteína a polisacáridos adicionales o viceversa (no mostrado; véase la ilustración en la figura 3).

- 5 La **figura 5A** ilustra la despolimerización y activación de polisacárido de serogrupo Y. El polisacárido se despolimeriza usando, por ejemplo, temperatura elevada y después se activa por tratamiento con metaperiodato de sodio, que escinde los dioles vecinales tales como, por ejemplo, entre el carbono 7 y 8 del resto de ácido siálico y los oxida en aldehídos.
- 10 La **figura 5B** ilustra la formación de un conjugado de polisacárido de serogrupo Y-proteína (por ejemplo, TT) mediante aminación reductora. Una amina primaria de la proteína (PR) (por ejemplo, cadena lateral de lisina o extremo N) reacciona con un aldehído de un polisacárido de serogrupo Y activado, despolimerizado (PS) para formar un intermedio de base de Schiff (no mostrado). El intermedio se reduce (por ejemplo, usando piridinaborano, picolinaborano, o un cianoborohidruro) para dar un enlace de amina secundaria. Las moléculas de proteína individuales pueden reaccionar con más de un polisacárido y viceversa (no mostrado; véase la ilustración en la figura 3). Los aldehídos sin reaccionar se pueden cubrir, es decir, reducirse a alcoholes, usando un agente reductor adecuado tal como borohidruro de sodio después de la reducción de la base de Schiff (no mostrada).
- 15 La **figura 5C** muestra un producto de la reacción de la figura 5B con una posible estructura de la unidad repetitiva de polisacárido ligada extendida. Es posible el enlace de la proteína a polisacáridos adicionales o viceversa (no mostrado; véase la ilustración en la figura 3).
- 20 La **figura 5C** muestra un producto de la reacción de la figura 5B con una posible estructura de la unidad repetitiva de polisacárido ligada extendida. Es posible el enlace de la proteína a polisacáridos adicionales o viceversa (no mostrado; véase la ilustración en la figura 3).
- 25 La **figura 6** muestra el porcentaje de sujetos en los grupos 1-4 que consiguieron concentraciones de hSBA mayores de o iguales a 1:8 para los serogrupos A, C, Y y W a los 30 días (D30) después de la última administración de vacuna.
- 30 La **figura 7** muestra el porcentaje de sujetos en los grupos 1-4 que consiguieron concentraciones de rSBA mayores de o iguales a 1:8 para los serogrupos A, C, Y y W en D30 después de la última administración de vacuna.
- 35 La **figura 8** muestra el porcentaje acumulativo de participantes que informaron de una o más reacciones declaradas en el sitio de inyección en 7 días después de la administración de la vacuna MenACYW-TT.
- 40 La **figura 9** muestra el porcentaje de sujetos con reacciones sistémicas declaradas en 7 días desde la administración de vacuna MenACYW-TT más vacunas de rutina o solo vacunas de rutina.
- 45 La **figura 10** muestra el porcentaje de sujetos que consiguen concentraciones de hSBA de $\geq 1:8$ para diferentes serogrupos en D30 después de la administración de vacuna MenACYW-TT o Menomune®-A/C/Y/W-135 (MPSV4).
- 50 La **figura 11** muestra un resumen de las medias geométricas de las concentraciones (GMT) de hSBA en D30 después de la administración de vacuna MenACYW-TT o MPSV4.
- 55 La **figura 12** muestra el porcentaje de sujetos que consiguen concentraciones de rSBA de $\geq 1:8$ para diferentes serogrupos en D30 después de la administración de vacuna MenACYW-TT o MPSV4.
- 60 La **figura 13** muestra el porcentaje de sujetos con reacciones declaradas en el sitio de inyección por tipo y grado después de la administración de vacuna MenACYW-TT o MPSV4.
- 65 La **figura 14** muestra el porcentaje de sujetos con reacciones sistémicas declaradas por tipo y grado después de la administración de la vacuna MenACYW-TT o MPSV4.
- La **figura 15** muestra el porcentaje de sujetos que consiguen serorrespuesta a vacuna de hSBA en D30 después de la administración de vacuna MenACYW-TT o MCV4-TT.
- La **figura 16** muestra la media geométrica de hSBA después de la vacunación tras la administración de vacuna MenACYW-TT o MCV4-TT.
- La **figura 17** muestra reacciones declaradas en el sitio de inyección en D0-D7 después de administración de vacuna MenACYW-TT o MCV4-TT.
- La **figura 18** muestra reacciones sistémicas declaradas en D0-D7 después de la administración de vacuna MenACYW-TT o MCV4-TT.

III. Descripción detallada de realizaciones de la invención

Ahora se hará referencia en detalle a determinadas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. Aunque la invención se describirán junto con las realizaciones ilustradas, se entenderá que no pretenden limitar la invención a esas realizaciones. Por el contrario, la invención pretende cubrir todas las alternativas, modificaciones y equivalentes, que pueden incluirse dentro de la invención definida por las reivindicaciones adjuntas.

5 Antes de describir los presentes contenidos en detalle, debe entenderse que la divulgación no se limita a composiciones o etapas de proceso específicas, ya que estas pueden variar. Debe apreciarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/o", "una" y "el/la" incluyen 10 referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un conjugado" incluye una pluralidad de conjugados y la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de células y similares.

15 Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Se entiende que los valores medidos y 20 medibles son aproximados, teniendo en cuenta los dígitos significativos y el error asociado con la medición. Además, el uso de "comprender", "comprende", "que comprende", "contener", "contiene", "que contiene", "incluir", "incluye" y "que incluye" no pretenden ser limitantes. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada son ejemplares y explicativas únicamente y no son restrictivas de los contenidos.

25 20 Salvo que se indique específicamente en la memoria descriptiva anterior, las realizaciones de la memoria descriptiva que indican "que comprenden" diversos componentes también se contemplan como "que consisten en" o "que consisten esencialmente en" los componentes indicados; realizaciones en la memoria descriptiva que indican "que consisten en" diversos componentes también se contemplan como "que comprenden" o "que consisten esencialmente en" los componentes indicados; y realizaciones en la memoria descriptiva que indican "que consisten esencialmente en" diversos componentes también se contemplan como "que consisten en" o "que comprenden" los componentes indicados (esta capacidad de intercambio no se aplica al uso de estos términos en las reivindicaciones).

30 35 Los encabezados de sección usados en este documento son con propósitos organizativos únicamente y no deben interpretarse como limitantes de la materia en cuestión deseada de ninguna manera. En el caso de que cualquier publicación incorporada por referencia contradiga cualquier término definido en esta memoria descriptiva, esta memoria descriptiva prevalecerá. Aunque los presentes contenidos se describen junto con diversas realizaciones, no se pretende que los presentes contenidos estén limitados a dichas realizaciones. Por el contrario, los presentes contenidos abarcan diversas alternativas, modificaciones y equivalentes, como apreciarán los expertos en la materia.

35 **A. Definiciones**

40 Salvo que se indique de otro modo, los siguientes términos y expresiones, como se usan en este documento, pretenden tener los siguientes significados:

45 40 La expresión "o combinaciones de los mismos", como se usa en este documento, se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los términos enumerados que preceden la expresión. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de los mismos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC y, si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, ACB, CBA, BCA, BAC o CAB. Siguiendo con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AAB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, y así sucesivamente. Los expertos en la materia entenderán que típicamente no hay límite sobre el número de elementos o términos en cualquier combinación, salvo que sea evidente de otro modo a partir del contexto.

50 55 Como se usa en este documento, el término "kit" se refiere a un conjunto envasado de componentes relacionados, tal como uno o más compuestos o composiciones y uno o más materiales relacionados, tales como disolventes, soluciones, tampones, instrucciones o desecantes.

60 65 "O" se usa en sentido inclusivo, es decir, equivalente a "y/o", salvo que el contexto requiera lo contrario.

55 Los términos "conector" y "enlace" se usan indistintamente y significan un resto químico que comprende una cadena de átomos que une covalentemente, o se une a, elementos tales como una proteína transportadora o un polisacárido.

60 65 "Resto conector" significa un grupo, sustituyente o resto reactivo químicamente, por ejemplo, un nucleófilo o electrófilo, que puede reaccionar con otra molécula para formar un enlace mediante unión covalente.

65 "Alquilo" significa un radical hidrocarbonado saturado o insaturado, ramificado, de cadena lineal o cíclico obtenido mediante eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono individual de un alcano, alqueno o alquino precursor. Grupos alquilo típicos consisten en 1 a 12 carbonos saturados y/o insaturados, incluyendo, aunque sin limitación, metilo, etilo, propilo, butilo y similares.

Una "unidad repetitiva" es el residuo mono- u oligosacárido que se polimeriza en un polisacárido. Las unidades repetitivas de MenA y MenC son monosacáridos (N-acetilmanosamina y ácido siálico, respectivamente) y las unidades repetitivas de MenW-135 y MenY son disacáridos (de ácido siálico y glucosa para MenY, o ácido siálico y galactosa para MenW-135). Las unidades repetitivas pueden variar de una a la siguiente con respecto a las cadenas laterales (por ejemplo, O-acetilación) y/o modificaciones tales como las divulgadas en este documento.

5 MenA, MenC, MenW-135 y MenY se usan como abreviatura para *Neisseria meningitidis* de serogrupo A, C, W-135 o Y, respectivamente, o el polisacárido capsular de los mismos (como en el caso de, por ejemplo, un "conjugado MenC" 10 que significa un conjugado del polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* de serogrupo C con una proteína transportadora).

B. Composiciones de vacuna ejemplares

15 En algunas realizaciones, se proporciona una composición de vacuna. En algunas realizaciones, la composición de vacuna comprende un conjugado de polisacárido capsular MenC con una proteína transportadora. La composición de vacuna descrita en este documento comprende un conjugado de polisacárido capsular MenA con una proteína transportadora. La composición de vacuna descrita en este documento comprende un conjugado de polisacárido capsular MenW-135 con una proteína transportadora. La composición de vacuna descrita en este documento comprende un conjugado de polisacárido capsular MenY con una proteína transportadora. En algunas realizaciones, 20 la composición de vacuna comprende al menos dos, al menos tres o al menos cuatro conjugados de un polisacárido capsular con una proteína transportadora. Los al menos dos, al menos tres o al menos cuatro conjugados de un polisacárido capsular con una proteína transportadora pueden ser conjugados de polisacáridos capsulares de diferentes serogrupos de *Neisseria meningitidis*, por ejemplo, conjugados de polisacáridos capsulares MenA, MenC, MenY y MenW con una proteína transportadora, en donde la proteína transportadora es toxoide tetánico.

25 Los polisacáridos capsulares pueden prepararse de acuerdo con el método descrito en el documento US 2003/0068336 ejemplo 1. Los polisacáridos capsulares también pueden prepararse usando el medio y los métodos descritos en el documento US 6.933.137, por ejemplo.

30 En este documento se divulan conjugados que comprenden proteínas transportadoras. Ejemplos de vehículos proteínicos se analizan en, por ejemplo, Pichichero ME. Protein carriers of conjugate vaccines: Characteristics, development, and clinical trials. Human Vaccines Immunotherapeutics. 2013;9(12):2505-2523. doi:10.4161/hv.26109. Como se describe en este documento, la proteína transportadora comprende o consiste en exoproteína alfa recombinante (REPA), toxoide diftérico, CRM197, toxoide tetánico o un fragmento C de toxina tetánica. En algunas 35 realizaciones, el vehículo proteínico es toxoide tetánico.

40 En algunas realizaciones, el toxoide tetánico (TT) se prepara mediante extracción, purificación con sulfato de amonio e inactivación con formol de la toxina de cultivos de *Clostridium tetani* (cepa Harvard) cultivados en un medio de Mueller y Miller o un medio de Mueller y Miller modificado. En algunas realizaciones, el TT se procesa para reducir el formaldehído residual, se concentra en cloruro de sodio y se esteriliza con filtro. En algunas realizaciones, el TT se purifica por cromatografía en lugar de purificación con sulfato de amonio. En algunas realizaciones, el medio de Mueller y Miller modificado no contiene infusión cardiaca de ternero. En algunas realizaciones, el *Clostridium tetani* se cultiva en el medio descrito en el documento WO2006/042542 en la tabla 3, página 16.

45 Determinadas realizaciones analizadas a continuación implican un rasgo característico, tal como un resto químico (por ejemplo, un hidroxilo o O-acetilación) o una conjugación con una proteína transportadora, que está presente en una cantidad dada por unidad de masa de polisacárido. Por ejemplo, un determinado rasgo característico o combinación de rasgos característicos puede estar presente a un nivel tal como no menor de 25 nmol/mg de polisacárido. Esto significa que, en 1 mg de polisacárido, el rasgo característico o combinación de rasgos 50 característicos se produce al menos 15×10^{15} veces (donde 25 nmol = 25×10^{-9} mol $\times (6,02 \times 10^{23}$ artículos/mol) = 15×10^{15} artículos.

55 En algunas realizaciones, los polisacáridos del conjugado de polisacárido capsular MenC con la proteína transportadora tienen un nivel de O-acetilación que varía de 0,3 μ mol/mg de polisacárido a 1,6 μ mol/mg de polisacárido. En algunas realizaciones, el nivel de O-acetilación es mayor de o igual a 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 o 1,2 μ mol/mg de polisacárido. En algunas realizaciones, el nivel de O-acetilación es menor de o igual a 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 o 1,5 μ mol/mg de polisacárido. Por ejemplo, el nivel puede variar de 0,6 a 1,5 μ mol/mg de polisacárido o de 0,8 a 1,4 μ mol/mg de polisacárido. El contenido de O-acetilo puede medirse por el método de Hestrin (Hestrin et al., J. Biol. Chem. 1949, 180, pág. 249).

60 En algunas realizaciones, al menos uno de los conjugados en la composición tiene un peso molecular promedio en peso que varía de 300 kDa a 1500 kDa. En algunas de dichas realizaciones, el peso molecular promedio en peso es mayor de o igual a 400 kDa, 500 kDa, 600 kDa, 700 kDa, 800 kDa, 900 kDa, 1000 kDa o 1100 kDa. En algunas de dichas realizaciones, el peso molecular promedio en peso es menor de o igual a 600 kDa, 700 kDa, 800 kDa, 900 kDa, 1000 kDa, 1100 kDa, 1200 kDa, 1300 kDa o 1400 kDa. El peso molecular promedio en peso puede determinarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, dispersión de luz de múltiple ángulo (MALS). En algunas realizaciones,

al menos un conjugado en la composición comprende (es decir, es una población de moléculas que comprenden) moléculas que tienen un peso molecular en el intervalo de 700 kDa a 1400 kDa. Debe apreciarse que algunas moléculas de la población pueden tener un peso en el intervalo independientemente de si el peso molecular promedio en peso o promedio en número está en el intervalo o no. Por ejemplo, una población de moléculas con un peso molecular promedio en peso de 600 kDa o 1500 kDa probablemente contendrá moléculas que tienen un peso molecular en el intervalo de 700 kDa a 1400 kDa. En algunas realizaciones, al menos un conjugado en la composición comprende moléculas que tienen un peso molecular en el intervalo de 800 kDa a 1300 kDa. En algunas realizaciones, al menos un conjugado en la composición comprende moléculas que tienen un peso molecular en el intervalo de 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400 o 1400-1500 kDa. En algunas realizaciones, un conjugado MenA tiene un peso molecular como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, un conjugado MenC tiene un peso molecular como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, un conjugado MenW-135 tiene un peso molecular como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, un conjugado MenY tiene un peso molecular como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, un peso molecular se determina usando dispersión de luz de múltiple ángulo (MALS). En algunas realizaciones, un peso molecular se determina usando cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC).

Como se describe en este documento, un conjugado, tal como un conjugado de MenC, es una población que comprende polisacáridos conjugados ligados en un extremo, polisacáridos ligados en ambos extremos o una combinación de los mismos. Un polisacárido conjugado ligado en un extremo se une en un extremo a una proteína transportadora. Un polisacárido conjugado ligado en ambos extremos se une en ambos extremos a una proteína transportadora. Los polisacáridos conjugados ligados en el extremo pueden formarse, por ejemplo, escindiendo y activando dioles vecinal en la cadena principal de polisacárido para exponer los extremos activados, tal como por tratamiento con peryodato. Por ejemplo, el polisacárido MenC tiene un 7,8 diol vecinal en su unidad repetitiva de ácido siálico en la medida en que las posiciones 7 y 8 no están O-acetiladas en la misma unidad repetitiva. Este diol vecinal está en la cadena principal del polisacárido porque escindirlo separa un sacárido del siguiente, es decir, el diol vecinal no forma parte de una cadena lateral. Después de la activación, los extremos activados entonces pueden reaccionar con una proteína transportadora (o con el conector que entonces estará o ya está unido a una proteína transportadora), para formar un conjugado de polisacárido ligado en el extremo. Un conjugado está ligado en un extremo si solamente uno de los extremos (residuos sacáridos terminales) del polisacárido está ligado a una proteína transportadora (incluyendo a través de un conector, si fuera aplicable). Un conjugado ligado en ambos extremos tiene proteínas transportadoras ligadas en ambos extremos del polisacárido. En general, usar una estequiometría superior de polisacárido con respecto a la proteína transportadora o una concentración de reactante global inferior desviará la reacción de conjugación hacia productos ligados en un extremo. En contraste, una estequiometría inferior de polisacárido con respecto a la proteína transportadora o una concentración de reactante global superior desviará la reacción de conjugación hacia productos ligados en ambos extremos.

En algunas realizaciones, los polisacáridos conjugados ligados en un extremo (por ejemplo, conjugados MenC) tienen un sacárido no ligado terminal en que hay un hidroxilo primario en la posición 7, o en donde el extremo reductor está modificado con un (2-hidroxi)etoxi. Esto puede resultar de la activación de un polisacárido que comprende 7,8 dioles vecinales con peryodato (que dan aldehídos terminales), conjugación en un extremo y reducción del aldehído sin reaccionar en el otro extremo, por ejemplo, con un reactivo de borohidruro. El hidroxilo primario en la posición 7 puede considerarse el extremo de un residuo de ácido siálico truncado. El extremo reductor que está modificado con un (2-hidroxi)etoxi puede considerarse un residuo de ácido siálico unido en su extremo reductor al fragmento de los carbonos 9 y 8 de otro residuo y sus oxígenos asociados.

Como se describe en este documento, el conjugado es un polisacárido MenW-135 y/o MenY, que comprende una o más modificaciones elegidas de (i) un hidroxilo primario en una posición de un diol vecinal en un polisacárido MenW-135 o MenY natural y (ii) una conjugación con la proteína transportadora, en donde las modificaciones están presentes a no menos de 60 nmol/mg de polisacárido. Las modificaciones pueden realizarse mediante oxidación con peryodato seguida de conjugación con la proteína transportadora y reducción de los aldehídos sin reaccionar. La escisión impulsada por peryodato de los residuos sacáridos puede producirse en posiciones de dioles vecinales tales como las posiciones 7,8 o 8,9 del ácido siálico y también posiblemente en el anillo de hexosa de la unidad repetitiva, particularmente donde los dioles están en una disposición *cis*. En algunas realizaciones, las modificaciones están presentes en una cantidad menor de 200 nmol/mg de polisacárido, menor de 150 nmol/mg de polisacárido, menor de 150 nmol/mg de polisacárido, menor de 100 nmol/mg de polisacárido o menor de 80 nmol/mg de polisacárido.

En algunas realizaciones, un polisacárido se liga a una proteína transportadora a través de una amina secundaria. En algunas realizaciones, un polisacárido se une a la proteína transportadora como se muestra en la fórmula II:



en donde PS indica unión al polisacárido y PR indica unión a la proteína transportadora. Dicho enlace a amina secundaria puede formarse, por ejemplo, a través de aminación reductora en que una amina primaria en una proteína (por ejemplo, grupo de extremo N o amino de una cadena lateral de lisina) ataca un grupo activado (por ejemplo, aldehído) en un polisacárido, formando una base de Schiff, que después se reduce para formar la amina secundaria.

La reducción puede realizarse usando un reactivo reductor adecuado tal como un cianoborohidruro (por ejemplo, cianoborohidruro de sodio) o un borano (por ejemplo, piridinaborano o picolinaborano).

5 En algunas realizaciones, un conjugado de un polisacárido MenC está reducido en tamaño en 3x-8x con respecto al polisacárido MenC natural, por ejemplo, 3x-4x, 4x-5x, 5x-6x, 6x-7x o 7x-8x. La escisión con peryodato separa las unidades repetitivas adyacentes y, por tanto, proporciona reducción en el tamaño del polisacárido. El tamaño puede reducirse además mediante un tratamiento tal como calor y/o ácido, por ejemplo, antes del tratamiento con peryodato. También pueden usarse otros tratamientos conocidos para reducir el tamaño, tales como sonicación o microfluidización.

10 10 En algunas realizaciones, un conjugado de un polisacárido MenA tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,3 a 1,5, por ejemplo, 0,3 a 0,4, 0,4 a 0,5, 0,5 a 0,6, 0,6 a 0,7, 0,7 a 0,8, 0,8 a 0,9, 0,9 a 1,0, 1,0 a 1,1, 1,1 a 1,2, 1,2 a 1,3, 1,3 a 1,4 o 1,4 a 1,5. En algunas realizaciones, un conjugado de un polisacárido MenA tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,5 a 1,5.

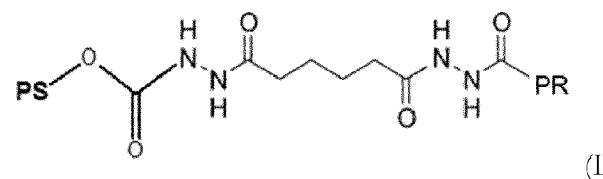
15 15 En algunas realizaciones, un conjugado de un polisacárido MenC tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,3 a 1,1, por ejemplo, 0,3 a 0,4, 0,4 a 0,5, 0,5 a 0,6, 0,6 a 0,7, 0,7 a 0,8, 0,8 a 0,9, 0,9 a 1,0 o 1,0 a 1,1.

20 20 En algunas realizaciones, un conjugado de un polisacárido MenW-135 tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,3 a 1,3, por ejemplo, 0,3 a 0,4, 0,4 a 0,5, 0,5 a 0,6, 0,6 a 0,7, 0,7 a 0,8, 0,8 a 0,9, 0,9 a 1,0, 1,0 a 1,1, 1,1 a 1,2 o 1,2 a 1,3.

25 25 Un conjugado de un polisacárido MenY como se describe en este documento tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,5 a 1,3, por ejemplo, 0,3 a 0,4, 0,4 a 0,5, 0,5 a 0,6, 0,6 a 0,7, 0,7 a 0,8, 0,8 a 0,9, 0,9 a 1,0, 0,9 a 1,0, 1,0 a 1,1, 1,1 a 1,2 o 1,2 a 1,3.

30 30 En algunas realizaciones, una composición de vacuna proporcionada en este documento comprende menos de un 20 % de polisacárido libre en peso, por ejemplo, comprende menos de un 10 % de polisacárido libre en peso, menos de un 5 % de polisacárido libre en peso o sustancialmente carece de polisacárido libre. "Sustancialmente carece de polisacárido libre" significa que el nivel de polisacárido libre está por debajo del límite de detección de un ensayo de precipitación con desoxicícolato en que el polisacárido conjugado con proteína se precipita con desoxicícolato y se ensaya el polisacárido que queda en solución, por ejemplo, como se describe en Lei *et al.*, "Quantification of free polysaccharide in meningococcal polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccines," *Dev Biol (Basilea)*. 2000; 103:259-64 (PMID: 11214246).

35 35 En algunas realizaciones, un polisacárido se une a la proteína transportadora a través de un conector que comprende 2-10 carbonos lineales, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 carbonos. "Carbonos lineales" son carbonos a lo largo de la cadena que va desde el polisacárido a la proteína transportadora y no incluyen carbonos en una ramificación desde esta cadena. Como se describe en este documento, el conector comprende un espaciador entre un primer carbonilo y un segundo carbonilo, y el espaciador comprende 4-8 carbonos (por ejemplo, 4, 5, 6, 7 u 8 carbonos), que pueden ser carbonos lineales. El primer carbonilo puede formar parte de un carbamato. El segundo carbonilo puede formar parte de una amida. El primer carbonilo puede ser proximal al polisacárido y distal a la proteína transportadora. El segundo carbonilo puede ser proximal a la proteína transportadora y distal al polisacárido. El conector puede comprender un residuo de una dihidrazida, tal como dihidrazida de ácido adipíco (ADH). En algunas realizaciones, el polisacárido se une a la proteína transportadora a través de un conector de fórmula I:



50 50 en donde PS indica la unión al polisacárido y PR indica la unión a la proteína transportadora. Un polisacárido individual puede unirse a una o más de una proteína transportadora (en diferentes posiciones), y viceversa.

55 55 En algunas realizaciones, un conector está presente en un conjugado en una relación de un conector por 10-100 unidades repetitivas de sacárido, por ejemplo, 20-60. Esto incluye conectores a los que se une tanto una proteína transportadora como un polisacárido y también conectores unidos solamente al polisacárido, es decir, que no forman una unión a una proteína transportadora.

60 60 En algunas realizaciones, se proporciona un conjugado de un polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* con una proteína transportadora a través de un conector, en que el conector está presente en una cantidad de 1 conector por 10-100 unidades repetitivas del polisacárido, por ejemplo, 1 conector por 10-20 unidades repetitivas, 1 conector por

20-30 unidades repetitivas, 1 conector por 30-40 unidades repetitivas, 1 conector por 40-50 unidades repetitivas, 1 conector por 50-60 unidades repetitivas o 1 conector por 60-70 unidades repetitivas. En algunas realizaciones, un polisacárido MenA se une a la proteína transportadora a través de un conector como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, un polisacárido MenC se une a la proteína transportadora a través de un conector como se describe anteriormente.

5 En algunas realizaciones, una composición de conjugado de polisacárido de acuerdo con la divulgación tiene estabilidad mejorada con respecto a formulaciones existentes. En algunas realizaciones, la estabilidad se ensaya en términos de si los niveles de polisacárido libre correspondientes a cada polisacárido conjugado permanecen por debajo de un 40 % después de un período de almacenamiento a 2 °C-8 °C, por ejemplo, de 2,5, 3, 3,5, 4 o 4,5 años. En algunas realizaciones, la estabilidad se ensaya en términos de si los niveles de polisacárido libre correspondientes a cada polisacárido conjugado permanecen por debajo de un 40 % después de un período de almacenamiento a 23 °C-27 °C, por ejemplo, de 2, 3, 4, 5 o 6 meses. Determinadas vacunas tetravalentes de conjugado de polisacárido MenACYW requieren liofilización u otras medidas de conservación al menos en parte como resultado de la baja estabilidad como formulaciones líquidas con respecto a uno o más de los conjugados constituyentes. La liofilización complica tanto la fabricación como la administración con respecto a una formulación líquida única. En algunas realizaciones, un polisacárido se une a la proteína transportadora en múltiples puntos. La unión en múltiples puntos en general es una consecuencia de la química de conjugación, por ejemplo, activación con peryodato seguida de aminación reductora, o acoplamiento basado en carbonildiimidazol (opcionalmente con un conector) que puede formar una red de proteína transportadora y polisacárido, junto con un tamaño y relación de carga apropiados del polisacárido. Para un análisis detallado de dicha química ejemplar, véanse los ejemplos a continuación. Tamaños y relaciones de carga ejemplares de polisacárido compatible con la formación de una red de proteína-polisacárido que implique múltiples puntos de unión, son al menos 30 kDa (y los intervalos de tamaño ejemplares analizados anteriormente) y relaciones de polisacárido/proteína de 0,3 a 1,5 (y los intervalos de relación de carga ejemplares analizados anteriormente). Sin el deseo de limitarse a teoría particular alguna, proporcionar conjugados con múltiples puntos de unión entre el polisacárido y la proteína transportadora puede contribuir a estabilidad a largo plazo del conjugado, en que se necesitarían múltiples acontecimientos de escisión (por ejemplo, hidrolítica) para liberar fragmentos de polisacárido de la proteína transportadora. Esta contribución a la estabilidad a largo plazo puede ser especialmente pertinente para el polisacárido MenA, que tiene enlaces fosfodiéster que pueden ser más inestables durante 10 almacenamiento en líquido que los enlaces glucosídicos. En algunas realizaciones, una composición comprende un polisacárido MenA con múltiples puntos de unión a la proteína transportadora. En algunas realizaciones, una composición comprende un polisacárido MenC con múltiples puntos de unión a la proteína transportadora. En algunas realizaciones, una composición comprende un polisacárido MenY con múltiples puntos de unión a la proteína transportadora. En algunas realizaciones, una composición comprende un polisacárido MenW-135 con múltiples puntos de unión a la proteína transportadora. En algunas realizaciones, una composición comprende polisacáridos MenA, MenC, MenY, y MenW-135, en donde cada uno tiene múltiples puntos de unión a la proteína transportadora.

15

20

25

30

35

40 En algunas realizaciones, se proporciona una composición de vacuna descrita en este documento como una formulación líquida en una jeringa, por ejemplo, una jeringa prellenada y/o libre de silicona. En algunas realizaciones, dicha jeringa se envasa comercialmente para venta y/o distribución.

C. Métodos ejemplares para producir conjugados y vacunas

45 En este documento se proporcionan métodos para producir y/o purificar conjugados de un polisacárido capsular con una proteína transportadora.

50 Se considera que un reactivo (tal como un agente de activación) está presente en una cantidad dada en una etapa (por ejemplo, una etapa de activación) si está presente en dicha cantidad en cualquier momento durante la etapa o reacción pertinente (por ejemplo, cuando se inicia la reacción).

55 Se proporciona un método de producción de un conjugado de un polisacárido con una proteína transportadora. Un polisacárido puede des-O-acetilarse, por ejemplo, por hidrólisis alcalina. Por ejemplo, puede usarse un hidróxido tal como NaOH o KOH, por ejemplo, a una concentración entre 50-150, 60-140, 70-130, 80-120, 90-110 o 95-100 mM. El hidróxido puede estar a una concentración de 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mM. El hidróxido puede estar a una concentración de 100 mM. La des-O-acetilación puede realizarse en un tiempo y a una temperatura suficientes para des-O-acetilar el polisacárido en un 40 % a un 70 %, o en un 50 % a un 60 % en comparación con la cantidad de partida. La des-O-acetilación puede realizarse en un tiempo y a una temperatura suficientes para des-O-acetilar el polisacárido en un 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % en comparación con la cantidad de partida. Después de la des-O-acetilación, el polisacárido puede tener un grado de O-acetilación de 0,6 µmol/mg de polisacárido a 1,5 µmol/mg de polisacárido o de 0,8 a 1,4 µmol/mg de polisacárido. El grado de O-acetilación puede ser mayor de o igual a 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 µmol/mg de polisacárido.

60 En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación es menor de o igual a 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3 o 1,4 µmol/mg de polisacárido.

Un polisacárido puede despolimerizarse, por ejemplo, por calor, tratamiento ácido, sonicación, microfluidización o una combinación de los mismos, tal como calor y ácido. Por ejemplo, el polisacárido puede calentarse hasta 40 °C-80 °C (por ejemplo, 45 °C, 50, 55, 60, 65, 70 o 75) y/o exponerse a pH ligeramente ácido, tal como 5, 5,5, 6 o 6,5 o mayor. El polisacárido puede despolimerizarse hasta un peso molecular promedio en peso, por ejemplo, de 50 kDa a 200 kDa, tal como 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200.

Algunos métodos usan un agente de activación que puede formar un enlace carbamato, cuyos ejemplos son conocidos en la técnica. Un agente de activación que puede formar un enlace carbamato puede ser un compuesto que tiene un carbonilo unido a dos buenos grupos salientes, tales como heteroarilos N-ligados, tales como imidazol, piridina, pirimidina, purina, triazina, pirazina, tiazina, tiazol, etc. En algunas realizaciones, el agente de activación es carbonildiimidazol. El agente de activación puede estar presente en un exceso molar sobre el polisacárido en 20 veces a 50 veces, por ejemplo, 20 veces a 25 veces, 25 veces a 30 veces, 30 veces a 35 veces, 35 veces a 40 veces, 40 veces a 45 veces o 45 veces a 50 veces.

Un conector tal como un conector de dihidrazida puede hacerse reaccionar con un polisacárido activado, por ejemplo, en una relación molar de 0,3 a 1,0 con respecto a las unidades repetitivas de polisacárido, tal como de 0,3 a 0,4, de 0,4 a 0,5, de 0,5 a 0,6, de 0,6 a 0,7, de 0,7 a 0,8, de 0,8 a 0,9 o de 0,9 a 1,0. En algunas realizaciones, el conector de dihidrazida es dihidrazida de ácido adípico. En algunas realizaciones, el polisacárido se derivatiza con el conector, de modo que contiene un conector por 10-100 unidades repetitivas, por ejemplo, un conector por 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 o 90-100 unidades repetitivas. En algunas realizaciones, el polisacárido se derivatiza con el conector, de modo que contiene un conector por 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 unidades repetitivas.

Un polisacárido puede activarse por tratamiento con un oxidante, tal como un peryodato, por ejemplo, metaperyodato de sodio (también conocido como peryodato de sodio). El oxidante reacciona con el polisacárido para formar aldehídos. Los aldehídos pueden formarse en las cadenas laterales del polisacárido, por ejemplo, para polisacáridos MenW-135 y MenY. Los aldehídos pueden formarse escindiendo la cadena principal de polisacárido y se forman en los extremos, por ejemplo, para polisacáridos MenC. El tratamiento oxidante puede realizarse usando el oxidante a aproximadamente 2 mM, por ejemplo, de 1,5 a 3 mM. El tratamiento oxidante puede realizarse a 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 230 mM. El tratamiento oxidante puede realizarse a una temperatura y tiempo suficientes para producir al menos 20 nmol/mg de polisacárido, por ejemplo, 20-30, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-100, 20-150, 20-160, 20-170, 20-180, 20-190 o 20-200 nmol/mg. El tratamiento oxidante puede realizarse a una temperatura y tiempo suficientes para producir al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 nmol/mg de polisacárido. El tratamiento oxidante puede ser a un pH que varía de 6,5 a 9,5, o tiene un pH de 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 o 9,5. El tratamiento oxidante puede realizarse en una solución líquida por debajo de temperatura ambiente, por ejemplo, menor de 20 °C, 15 °C, 10 °C o 5 °C.

cuando la conjugación es mediante aminación reductora, pueden reducirse bases de Schiff con un agente reductor adecuado tal como un cianoborohidruro (por ejemplo, NaCNBH₃) o un borano tal como piridinaborano o picolinaborano.

Después de la conjugación, cuando hay aldehídos sin reaccionar presentes, el conjugado puede estabilizarse reduciendo o aminando los aldehídos. Un borohidruro tal como NABH₄ es un reactivo reductor adecuado. Amoniaco, metilamina, glicina, alanina y similares son adecuados para aminar los aldehídos sin reaccionar.

La conjugación puede purificarse. Un método de purificación, que implica ultrafiltración en presencia de sulfato de amonio, se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.146.902. Como alternativa, los conjugados pueden purificarse de la proteína y el polisacárido sin reaccionar por muchas técnicas convencionales incluyendo, entre otras, cromatografía de exclusión por tamaño, centrifugación en gradiente de densidad, cromatografía de interacción hidrofoba, cromatografía en resina en modo mixto o fraccionamiento con sulfato de amonio. Véase, por ejemplo, P. W. Anderson, *et al.* (1986). *J. Immunol.* 137: 1181-1186. Véase también, H. J. Jennings y C. Lugowski (1981) *J. Immunol.* 127: 1011-1018.

Puede realizarse cromatografía de interacción hidrofoba (HIC). Puede usarse una resina tal como una resina de fenilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo o decilo. Puede cargarse una mezcla en la resina para purificar el conjugado del polisacárido libre. La mezcla comprende una sal, tal como sulfato de amonio. El pH de la mezcla que se carga se ajusta para llevar el pH más cerca del neutro. El pH de la mezcla que se carga está o se ajusta a 5,5-8,5, 6-8, 6,5 a 7,5, o 7. La sal puede estar presente a una concentración de, por ejemplo, 0,5 M a 1,5 M, tal como de 0,5 M a 0,7 M, de 0,7 M a 0,9 M, de 0,9 M a 1,1 M, de 1,1 M a 1,3 M o de 1,3 M a 1,5 M. Después de cargarla, la resina puede lavarse con una solución salina, por ejemplo, que comprende sulfato de amonio, en que la concentración de sal puede ser, por ejemplo, como se indica en la frase previa. La resina puede estar en una columna y el lavado es de al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis volúmenes de columna, por ejemplo, hasta 7, 8, 9 o 10 volúmenes de columna. La resina puede lavarse en lotes de una solución salina, por ejemplo, dos o más lotes teniendo el volumen acumulativo de los lotes un volumen al menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 veces el volumen de la mezcla antes de la carga. El conjugado puede

interactuar más fuertemente con la resina, por ejemplo, a alta fuerza iónica, y el polisacárido libre puede retirarse por lavado. El conjugado puede eluirse de la resina después de lavado usando un eluyente de baja fuerza iónica, tal como agua, por ejemplo, WFI. Como alternativa, puede usarse una solución de baja salinidad, por ejemplo, que tiene una concentración salina (por ejemplo, una sal acetato, tal como acetato de sodio) menor de o igual a 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01 o 0,005 M. El eluido puede comprender menos de un 20 % de polisacárido libre en peso, por ejemplo, comprende menos de un 10 % de polisacárido libre en peso, menos de un 5 % de polisacárido libre en peso, o sustancialmente carece de polisacárido libre.

Como se describe en este documento, un método de producción de un conjugado de un polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* con una proteína transportadora comprende

- a) activar el polisacárido con un agente de activación que puede formar un enlace carbamato (por ejemplo, carbonildiimidazol) en donde el agente de activación está presente en un exceso molar sobre el polisacárido de 20 veces a 50 veces;
- b) inactivar el agente de activación (por ejemplo, usando agua) y derivatizar el polisacárido activado con un conector de dihidrazida añadido a una relación molar de 0,3 a 1,0 con respecto a las unidades repetitivas de polisacárido, en donde el polisacárido se derivatiza a una relación de un conector de dihidrazida por 10-100 unidades repetitivas de sacárido;
- c) conjugar el polisacárido derivatizado con la proteína transportadora mediante química de carbodiimida, en donde el polisacárido está presente al inicio de la reacción de conjugación a una relación ponderal de 3:1 a 5:1 con respecto a la proteína transportadora, formando de ese modo el conjugado.

Como se describe en este documento, el método de producción de un conjugado de un polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* con una proteína transportadora comprende

- a) des-O-acetilar parcialmente el polisacárido mediante hidrólisis alcalina;
- b) activar el polisacárido mediante tratamiento con peryodato, convirtiendo de ese modo los dioles en aldehídos hasta un grado de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 50 nmol de aldehído por mg de polisacárido;
- c) conjugar el polisacárido activado con la proteína transportadora mediante aminación reductora, en donde el polisacárido está presente en la reacción de conjugación a una relación ponderal de 0,5-1 a 5:1 con respecto a la proteína transportadora, formando de ese modo el conjugado.

Como se describe en este documento, un método de producción de un conjugado de un polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* con una proteína transportadora comprende

- a) activar el polisacárido mediante tratamiento con peryodato, convirtiendo de ese modo los dioles en aldehídos hasta un grado de al menos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 o 75 nmol de aldehído por mg de polisacárido; y
- b) conjugar el polisacárido activado con la proteína transportadora mediante aminación reductora, en donde el polisacárido está presente en la reacción de conjugación a una relación ponderal de 1:1 a 5:1 con respecto a la proteína transportadora, formando de ese modo el conjugado.

Como se describe en este documento, el método de purificación puede comprender además purificar el conjugado por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).

A. Formulaciones de vacuna ejemplares

La formulación de las composiciones de vacuna de la presente invención puede realizarse usando métodos reconocidos en la técnica. Las composiciones/formulaciones de vacuna de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes. Los adyuvantes incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, adyuvantes de aluminio, adyuvante de Freund, BAY, DC-chol, pcpp, monofosforil lípido A, CpG, QS-21, toxina colérica y péptido de formilmctionilo. Véase, por ejemplo, Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach, 1995 (M. F. Powell y M. J. Newman, eds., Plenum Press, N.Y.). El adyuvante, si está presente, puede ser un adyuvante de aluminio, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio. En algunas realizaciones, las composiciones y formulaciones de vacuna, por ejemplo, la vacuna MenACWY-TT no comprende adyuvante. En algunas realizaciones, las composiciones y formulaciones de vacuna, por ejemplo, la vacuna MenACWY-TT comprende adyuvante.

Las composiciones y formulaciones de vacuna (por ejemplo, vacunas de conjugado/vacuna MenACWY-TT) de la presente invención pueden administrarse como una sola dosis o en una serie (es decir, con un "refuerzo" o "refuerzos"), o como un refuerzo después de administración previa de una vacuna diferente contra *Neisseria meningitidis*, tal como una vacuna de conjugado de sacárido capsular de *Neisseria meningitidis*. Por ejemplo, un niño podría recibir una sola

- 5 dosis al inicio de su vida, después administrarse una dosis de refuerzo hasta diez años después, como se recomienda actualmente para otras vacunas para prevenir enfermedades infantiles. En algunas realizaciones, una dosis de una vacuna descrita en este documento se administra de dos meses a diez años después de una vacuna de conjugado de sacárido vascular de *Neisseria meningitidis* administrada previamente, tal como de dos a cuatro meses, de cuatro a seis meses, de seis a doce meses, de 1 año a 2 años, de 2 años a 3 años, de 3 años a 4 años, de 4 años a 5 años, de 5 años a 6 años, de 6 años a 7 años, de 7 años a 8 años, de 8 años a 9 años o de 9 años a 10 años después de la vacuna de conjugado de sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* administrada previamente.
- 10 La dosis de refuerzo generará anticuerpos a partir de linfocitos B sensibilizados, es decir, una respuesta anamnésica. Es decir, las composiciones y formulaciones de vacuna, por ejemplo, la vacuna MenACWY-TT, provoca una alta respuesta primaria (es decir, después de una sola administración de vacuna) funcional de anticuerpos en poblaciones jóvenes y ancianas, y puede provocar una respuesta anamnésica (es decir, después de una administración de refuerzo), lo que demuestra que la respuesta inmunitaria protectora provocada por las composiciones y formulaciones de vacuna, por ejemplo, la vacuna MenACWY-TT de la presente invención es de vida larga.
- 15 15 En algunas realizaciones, la administración es inyección intramuscular. Como se describe en este documento, la administración puede ser subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, parenteral o intravenosa. Las composiciones y formulaciones pueden estar en mezcla con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, tal como solución salina tamponada con acetato de sodio, agua estéril, solución salina fisiológica o similares. Las composiciones/formulaciones 20 también pueden liofilizarse. Las composiciones/formulaciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Pueden consultarse textos convencionales, tales como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17.^a edición, 1985, para preparar preparaciones adecuadas, sin experimentación excesiva.
- 25 25 En algunas realizaciones, la composición/formulación de vacuna es una preparación líquida. En algunas realizaciones, la composición/formulación de vacuna, por ejemplo, vacuna MenACWY-TT, es una composición líquida a administrar por inyección a animales, niños, particularmente niños pequeños, adultos mayores, por ejemplo, de más de 55, 60, 65, 70, 75, 80 o 90.
- 30 30 En algunas realizaciones, la elección de vehículos adecuados y otros aditivos dependerá de la vía exacta de administración y la naturaleza de la forma farmacéutica particular.
- 35 35 En una realización, las composiciones y formulaciones de vacuna, por ejemplo, la vacuna MenACYW-TT, comprende un conservante, vehículo, tampón, excipiente o similar farmacéuticamente aceptable. En una realización, el conservante, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable aumenta o prolonga la vida útil de las composiciones. En algunas realizaciones, la vacuna comprende un tampón. En algunas realizaciones, el tampón es acetato de sodio. En algunas realizaciones, el tampón es fosfato de sodio. En algunas realizaciones, el tampón está presente a una concentración que varía de 10 mM a 100 mM, por ejemplo, de 10 mM a 70 mM, de 15 mM a 45 mM, de 20 mM a 40 mM, de 40 mM a 60 mM o de 60 mM a 100 mM. En algunas realizaciones, el tampón tiene un pH de 4,5 a 7,5, de 4,5 a 7,0, de 4,5 a 6,5, de 4,5 a 6,0, de 4,5 a 5,5 o de 4,5 a 5,0. En algunas realizaciones, el tampón tiene un pH que varía de 5,5 a 7,0, por ejemplo, de 5,75 a 6,25 o de 6,25 a 6,75. En algunas realizaciones, el tampón tiene un pH de 5,5 a 6,5. En algunas realizaciones, el tampón tiene un pH de 5 o 6. En algunas realizaciones, la composición de vacuna comprende una sal farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición/formulación de vacuna 40 comprende solución salina. En algunas realizaciones, la solución salina comprende o es NaCl. El NaCl puede estar presente a una concentración de un 0,45 % a un 0,9 % p/v, tal como de un 0,5 % a un 0,85 % p/v, o de un 0,6 % a un 0,8 % p/v, o un 0,6 %, 0,67 %, 0,75 %, 0,8 %, 0,85 % o 0,9 %.
- 45 45 En una realización, cada componente de la composición es químicamente inerte con respecto a los conjugados de polisacárido de *N. meningitidis*-vehículo proteínico.
- 50 50 En algunas realizaciones, las composiciones y formulaciones de vacuna, por ejemplo, la vacuna MenACWY-TT, se formula como una dosis unitaria individual. En algunas realizaciones, la dosis unitaria individual comprende de 6 µg a 15 µg de cada uno de los polisacáridos MenA, MenC, MenW-135 y MenY. En algunas realizaciones, la dosis unitaria individual comprende 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 µg de cada uno de los polisacáridos MenA, MenC, MenW-135 y MenY. En algunas realizaciones, la proteína transportadora está presente en una cantidad de aproximadamente 50 µg a 80 µg en la dosis unitaria individual. En algunas realizaciones, la proteína transportadora está presente en una cantidad de aproximadamente 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80 µg en la dosis unitaria individual.
- 55 55 En algunas realizaciones, las composiciones y formulaciones de vacuna, por ejemplo, la vacuna MenACWY-TT se formula como una dosis de 0,5 ml en acetato de sodio, solución salina tamponada con acetato de sodio o tampón similar. En algunas realizaciones, la dosis de 0,5 ml comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 µg de cada uno de los serogrupos A, C, Y y W-135 conjugados con 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85 o 90 µg de proteína toxoide tetánico. En algunas realizaciones, esta dosis de 0,5 ml se administra por vía intramuscular.
- 60 60 65

B. Métodos y usos ejemplares

En algunas realizaciones, se incluye un método de vacunación de un sujeto contra *Neisseria meningitidis*, que comprende administrar las composiciones o formulaciones de vacuna, por ejemplo, la vacuna MenACWY-TT, descritas en este documento. También se divulga un uso de la composición o formulación de vacuna descrita en este documento

5 para inmunizar a un sujeto contra *Neisseria meningitidis*. También se divulga un uso de la composición o formulación de vacuna descrita en este documento para la preparación de un medicamento para inmunizar a un sujeto contra *Neisseria meningitidis*.

10 En algunas realizaciones, el sujeto es de 12 meses de edad o mayor cuando se vacuna. En algunas realizaciones, el sujeto es un adulto mayor cuando se vacuna. En algunas realizaciones, el adulto mayor es de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 100 años de edad cuando se vacuna.

15 En algunas realizaciones, el sujeto es de 6 semanas a 3 años de edad cuando se vacuna. El sujeto puede tener 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas cuando se vacuna. En algunas realizaciones, el sujeto tiene 2 meses, 4 meses, 6 meses, 12 meses y/o 15 meses cuando se vacuna. En algunas realizaciones, el sujeto se vacuna en función de la edad. En

20 algunas realizaciones, al sujeto se le administran tres dosis de las composiciones o formulaciones de vacuna, por ejemplo, la vacuna MenACWY-TT, descritas en este documento a las 6-8, 10-12 y 14-16 semanas.

25 En algunas realizaciones, el sujeto se vacuna más de una vez durante toda su vida. En algunas realizaciones, el sujeto recibe una dosis de refuerzo 3 años o más después de la primera dosis. En algunas realizaciones, el sujeto recibe una

30 dosis de refuerzo 4 años o más después de la primera dosis. En algunas realizaciones, el sujeto se vacuna hasta tres veces antes de su primer cumpleaños, y una vez aproximadamente en o después de su primer cumpleaños. La primera vacuna puede ser a las 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas de edad. En algunas realizaciones, la primera o segunda vacunación es a los 3, 4 o 5 meses de edad. En algunas realizaciones, la primera, segunda o tercera vacunación es a los 5, 6 o 7 meses de edad. En algunas realizaciones, la primera, segunda, tercera o cuarta vacunación es a los 11,

35 12, 13, 14 o 15 meses de edad. En algunas realizaciones, la primera, segunda, tercera o cuarta vacunación es a los 14, 15, 16, 17 o 18 meses de edad. En algunas realizaciones, la primera vacunación es a los 6, 7, 8 o 9 meses y se administra una segunda vacunación hasta los 24 meses. En algunas realizaciones, el sujeto se vacuna como un adulto

40 mayor, independientemente de si había recibido o no previamente la vacuna MenACWY-TT u otra contra *Neisseria meningitidis*. En algunas realizaciones, el sujeto tiene 50 años de edad o más, 55 años o más, 60 años o más, o 65 años o más cuando se vacuna con las composiciones o formulaciones de vacuna, por ejemplo, la vacuna MenACWY-TT, descrita en este documento.

45 En algunas realizaciones, las composiciones o formulaciones de vacuna, por ejemplo, la vacuna MenACWY-TT, descrita en este documento, se administran al mismo tiempo que otras vacunas de rutina. En algunas realizaciones, las vacunas de rutina incluyen, por ejemplo, las vacunas Pentacel® (DTaP5-IPV/Hib), Prevnar® (PCV7), Prevnar 13®

50 (PCV13), RotaTeq® (RV5), ROTARIX® (RV1), ENGERIX-B® (HepB), RECOMBIVAX HB® (HepB), M-M-R® (MMR), M-M-R® II (MMR) y VARIVAX® (V). En algunas realizaciones, las vacunas de rutina incluyen, por ejemplo, Adacel® (Tdap5) y Gardasil® (HPV4). En algunas realizaciones, las vacunas de rutina incluyen DTaP5-IPV/HibHepB. Otras vacunas de

55 rutina son conocidas en la técnica y pueden proporcionarse al sujeto al mismo tiempo, antes o después de las composiciones o formulaciones de vacuna, por ejemplo, la vacuna MenACWY-TT, descrita en este documento.

IV. Ejemplos

45 Los siguientes son ejemplos de métodos, usos y composiciones divulgados en este documento. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras diversas realizaciones, dadas las descripciones generales y detalladas proporcionadas anteriormente. Los siguientes ejemplos se dan con el propósito de ilustrar los presentes contenidos y no se interpretarán como una limitación del alcance de la divulgación o las reivindicaciones.

50 1. Preparación de conjugados de grupo A

Ejemplo 1A

55 El polisacárido capsular purificado de grupo A se disuelve en un 10 % en peso de cloruro de tetrabutilamonio (TBAC) en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración diana de 8 mg/ml. La solución se mezcla hasta que el polisacárido se disuelve completamente a 19 - 25 °C. El polisacárido disuelto se activa mediante la adición de una concentración

60 diana de 35-45 de exceso molar de carbonildiimidazol (CDI) por unidad repetitiva de fosfato de N-acetilmanosamina (PS RU), y se mezcla durante 50 a 70 minutos a 19 - 25 °C (figura 1C, primera reacción; producto mostrado en la figura 1E). La solución de polisacárido se diluye 1:2 con WFI (50 % v/v) para ajustar la concentración del polisacárido

65 activado hasta 4 mg/ml en un 50 % de DMSO. La solución se derivatiza añadiendo dihidrazida de ácido adípico (ADH) (1,0 mol de ADH por 1-3 mol de PS RU) (figura 1C, segunda reacción; producto mostrado en la figura 1F) y se mezcla durante una noche a temperatura ambiente. La reacción da una cantidad de derivatización, de modo que hay una ADH unida por 10 a 100 unidades repetitivas de polisacárido, por ejemplo, una ADH unida por 20, 30, 40, 50 o 60 unidades

70 repetitivas de polisacárido. El polisacárido activado se concentra por ultrafiltración en una membrana de PES de 10 kDa de MWCO y después se diafiltra frente a 12 - 18 intercambios de volumen de solución salina fisiológica. La concentración diana es aproximadamente 30 mg/ml. El polisacárido activado se filtra y se almacena a 1-5 °C.

La proteína toxoide tetánico (TT) purificada se filtra a través de una membrana de 0,2 micrómetros y se almacena a 1-5 °C. El polisacárido derivatizado y la proteína tetánica concentrada se mezclan juntas, en una relación de 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 o 5:1. Se añade una alícuota de 100 mg/ml del agente reticulante 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) en tampón MES 1,0 M, pH 5,7 a la mezcla de polisacárido-proteína de modo que una concentración final de EDAC sea 10 mg/ml y de MES sea 100 mM. Se añade solución salina para dar concentraciones diana de 16 mg/ml de polisacárido y 4 mg/ml de TT. El pH final se ajusta a 5,5 - 5,9 y la reacción se mezcla a 15,6 - 23,9 °C durante 16-24 horas. Durante este tiempo, el EDAC y el TT reaccionan para formar un intermedio de O-acilisourea (figura 1B). El intermedio de O-acilisourea y el polisacárido derivatizado entonces forman un conjugado (figura 1G; productos mostrados en la figura 1H y la figura 1A).

Se añade sulfato de amonio a la reacción de conjugado para producir una concentración de sulfato de amonio 1 M. El pH se ajusta a 7 y se mezcla hasta que se disuelve a temperatura ambiente. La mezcla de reacción de conjugado se aplica a una columna de HIC compactada con resina de fenilo. El polisacárido no conjugado se eluye con 2 a 7 volúmenes de columna de solución de sulfato de amonio 1 M. El conjugado se eluye con WFI. En este ejemplo y posteriores, la purificación por HIC del conjugado puede proporcionar un producto en que menos de un 20 % del polisacárido en peso es polisacárido libre (no conjugado). El eluido de conjugado se diafiltra frente a 10 intercambios de volumen de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0, usando una membrana de PES de 100 kDa de MWCO. La filtración final del conjugado purificado se realiza usando una membrana de 0,2 micrómetros y el conjugado se almacena a 1 - 5 °C.

Ejemplo 1B

El polisacárido capsular purificado de grupo A se disuelve en cloruro de tetrabutilamonio (TBAC)/dimetilsulfóxido (DMSO) en peso hasta una concentración diana de 6 mg/ml. La solución se mezcla durante 16 a 24 horas a 19 - 25 °C. El polisacárido disuelto se activa mediante la adición de una concentración diana de 35-45 de exceso molar de carbonildiimidazol (CDI) por unidad repetitiva de fosfato de N-acetilmanosamina (PS RU), y se mezcla durante 50 a 70 minutos a 19 - 25 °C (figura 1C, primera reacción; producto mostrado en la figura 1E). La solución de polisacárido se diluye 1:2 con WFI (45 - 55 % v/v) de modo que el polisacárido activado está a una concentración diana de 3 mg/ml en un 50 % de DMSO.

La proteína toxoide tetánico (TT) purificada se filtra a través de una membrana de 0,2 micrómetros y se almacena a 1-5 °C. La proteína tetánica se añade hasta una concentración final de 1 mg/ml. Durante este tiempo, el polisacárido activado y el TT reaccionan para formar un conjugado con un enlace carbamato (figura 1D). La reacción prosigue durante una noche a temperatura ambiente.

Se añade sulfato de amonio a la reacción de conjugado para producir una concentración de sulfato de amonio 1 M. El pH se ajusta a 7 y se mezcla hasta que se disuelve a temperatura ambiente. La mezcla de reacción de conjugado se aplica a una columna de HIC compactada con resina de fenilo. El polisacárido no conjugado se eluye con 2 a 7 volúmenes de columna de solución de sulfato de amonio 1 M. El conjugado se eluye con WFI. En este ejemplo y posteriores, la purificación por HIC del conjugado puede proporcionar un producto en que menos de un 20 % del polisacárido en peso es polisacárido libre (no conjugado). El eluido de conjugado se diafiltra frente a 10 intercambios de volumen de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0, usando una membrana de PES de 100 kDa de MWCO. La filtración final del conjugado purificado se realiza usando una membrana de 0,2 micrómetros y el conjugado se almacena a 1 - 5 °C.

2. Preparación de conjugados de grupo C

Ejemplo 2A

El polisacárido capsular purificado de grupo C se disuelve en solución salina fisiológica hasta una concentración diana de 10 mg/ml. La solución se mezcla hasta que se disuelve. La temperatura de la solución de polisacárido se ajusta hasta 37 °C y se añade hidróxido de sodio (NaOH) hasta una concentración final diana de 100 mM de NaOH. La solución se mezcla y se incuba durante 20 minutos, proporcionando des-O-acetilación parcial, de modo que el polisacárido en el conjugado final tendrá un nivel de O-acetilación de 0,8 a 1,4 µmol de OAc/mg de polisacárido y/o una reducción de un 50 % a un 60 % con respecto al nivel de O-acetilación del material de partida. El polisacárido MenC natural tiene dos posibles posiciones de O-acetilación por unidad repetitiva de monosacárido, y en general tiene un nivel de O-acetilación global de un 40-45 % para todos los posibles sitios de O-acetilación. Un 50 % de reducción en los grupos O-acetilo con respecto al material de partida dará un nivel de O-acetilación global (de todos los posibles sitios de O-acetilación) de menos de un 25 %.

El pH se ajusta hasta 6 y la temperatura se disminuye hasta 15 °C. El polisacárido disuelto se activa mediante la adición de metaperyodato de sodio (figura 2B), de modo que la concentración diana es 2 mM. El pH se ajusta hasta 6 y la solución se mezcla a 15 °C. El peryodato oxida y escinde las posiciones de diol adyacentes, dando cadenas terminadas en aldehído. La reacción se mezcla hasta que el tamaño molecular medio se reduce hasta entre 50 000 y 100 000 dalton, como se determina por HPSEC. La actividad reductora (que refleja la cantidad de aldehídos) es de 40

5 a 100 nmol/mg de polisacárido. La reacción se interrumpe añadiendo glicerol en una cantidad de 0,5 ml de glicerol por gramo de polisacárido y mezclando durante un mínimo de 5 minutos. El polisacárido se concentra inicialmente por ultrafiltración usando un filtro de celulosa regenerado de 5 kDa de MWCO y después se diafiltra frente a 8 - 12 intercambios de volumen de tampón acetato de sodio 50 mM, pH 6,0. El material se concentra más hasta una concentración diana de 50 mg/ml. El polisacárido despolimerizado/activado se filtra y se almacena.

10 La proteína toxoide tetánico purificada se concentra en una membrana de PES de 10 kDa de MWCO hasta una concentración final diana de hasta 100 mg/ml y después se pasa a través de un filtro de 0,2 micrómetros. La solución de proteína filtrada se almacena a 1-5 °C. El polisacárido despolimerizado/activado y la proteína tetánica concentrada se mezclan juntos, en una relación en masa de 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 o 5:1 (polisacárido:proteína). Se añade una alícuota de 100 mg/ml de cianoborohidruro de sodio en tampón fosfato 2,0 M a la mezcla de polisacárido-proteína, de modo que el cianoborohidruro de sodio es de 10 mg/ml y el tampón fosfato es de 200 mM, pH 8,0. Se añade solución salina para ajustar las concentraciones, por ejemplo, hasta una diana de 15-50 mg/ml para polisacárido. La reacción (figura 2C) se mezcla a 37 °C durante 16 - 30 horas. La reacción se diluye 1:2 con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 6 mM. Se añade una alícuota de 100 mg/ml de borohidruro de sodio en PBS 6 mM a la mezcla de reacción para obtener una diana de 0,5 mg de borohidruro de sodio por ml de volumen de reacción. La reacción se mezcla durante un mínimo de 15 minutos a temperatura ambiente. El borohidruro de sodio cubre los aldehídos sin reaccionar, reduciéndolos a alcoholes, dando un sacárido no ligado terminal con un hidroxilo primario en la posición 7, o en donde el extremo reductor se modifica con un (2-hidroxi)etoxi. Los productos (sacáridos terminales no mostrados) se ilustran en la figura 2D y la figura 2A. La solución de conjugación se diafiltra frente a 10 intercambios de volumen de PBS 6 mM en una membrana de PES de 50 kDa de MWCO. La solución se almacena a 1-5 °C.

15 Se añade sulfato de amonio a la reacción de conjugado para producir una concentración de sulfato de amonio 1 M. El pH se ajusta a 7 y se mezcla hasta que se disuelve a temperatura ambiente. La mezcla de reacción de conjugado se aplica a una columna de HIC compactada con resina de fenilo. El polisacárido no conjugado se eluye con 2 a 7 volúmenes de columna de solución de sulfato de amonio 1 M. El conjugado se eluye con WFI. En este ejemplo y posteriores, la purificación por HIC del conjugado puede proporcionar un producto en que menos de un 20 % del polisacárido en peso es polisacárido libre (no conjugado). El eluido de conjugado se diafiltra frente a 10 intercambios de volumen de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0, usando una membrana de PES de 100 kDa de MWCO. La filtración final del conjugado purificado se realiza usando una membrana de 0,2 micrómetros y el conjugado se almacena a 1 - 5 °C.

Ejemplo 2B

25 El polisacárido capsular purificado de grupo C se disuelve en solución salina fisiológica hasta una concentración diana de 10 mg/ml. La solución se mezcla hasta que se disuelve. El pH se ajusta hasta 6,0 y la temperatura se cambia hasta 15 °C. El polisacárido disuelto se activa mediante la adición de metaperiodato de sodio (figura 2B), de modo que la concentración diana cambiarse 2 mM. La reacción se mezcla hasta que el tamaño molecular medio es entre 50 000 y 100 000 dalton, como se determina por HPSEC. La reacción se interrumpe añadiendo glicerol en una cantidad de 0,5 ml de glicerol por gramo de polisacárido y mezclando durante un mínimo de 5 minutos. El polisacárido se concentra inicialmente por ultrafiltración usando un filtro de celulosa regenerado de 5 kDa de MWCO y después se diafiltra frente a 8 - 12 intercambios de volumen de tampón acetato de sodio 50 mM, pH 6,0. El material se concentra más hasta una concentración diana de 50 mg/ml. El polisacárido despolimerizado/activado se filtra y se almacena a 1-5 °C.

30 La proteína toxoide tetánico purificada se concentra en una membrana de PES de 10 kDa de MWCO hasta una concentración final diana de hasta 100 mg/ml y después se pasa a través de un filtro de 0,2 micrómetros. La solución de proteína filtrada se almacena a 1-5 °C. El polisacárido despolimerizado/activado y la proteína tetánica concentrada se mezclan juntos, en una relación molar de 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 o 5:1 (polisacárido:proteína). Se añade una alícuota de 100 mg/ml de cianoborohidruro de sodio en tampón fosfato 2,0 M a la mezcla de polisacárido-proteína, de modo que el cianoborohidruro de sodio es de 10 mg/ml y el tampón fosfato es de 200 mM, pH 8,0. Se añade solución salina para ajustar las concentraciones, por ejemplo, hasta una diana de 15-50 mg/ml para polisacárido. La reacción (figura 2C) se mezcla a 37 °C durante 16 - 30 horas. La reacción se diluye 1:2 con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 6 mM. Se añade una alícuota de 100 mg/ml de borohidruro de sodio en PBS 6 mM a la mezcla de reacción para obtener una diana de 0,5 mg de borohidruro de sodio por ml de volumen de reacción. La reacción se mezcla durante un mínimo de 15 minutos a temperatura ambiente. El borohidruro de sodio cubre los aldehídos sin reaccionar, reduciéndolos a alcoholes, dando un sacárido no ligado terminal con un hidroxilo primario en la posición 7, o en donde el extremo reductor se modifica con un (2-hidroxi)etoxi. Los productos (sacáridos terminales no mostrados) se ilustran en la figura 2D y la figura 2A. La solución de conjugación se diafiltra frente a 10 intercambios de volumen de PBS 6 mM en una membrana de PES de 50 kDa de MWCO. La solución se almacena a 1-5 °C.

35 Se añade sulfato de amonio a la reacción de conjugado para producir una concentración de sulfato de amonio 1 M. El pH se ajusta a 7 y se mezcla hasta que se disuelve a temperatura ambiente. La mezcla de reacción de conjugado se aplica a una columna de HIC compactada con resina de fenilo. El polisacárido no conjugado se eluye con 2 a 7 volúmenes de columna de solución de sulfato de amonio 1 M. El conjugado se eluye con WFI. En este ejemplo y posteriores, la purificación por HIC del conjugado puede proporcionar un producto en que menos de un 20 % del polisacárido en peso es polisacárido libre (no conjugado). El eluido de conjugado se diafiltra frente a 10 intercambios de volumen de PBS 6 mM en una membrana de PES de 50 kDa de MWCO. La solución se almacena a 1-5 °C.

de volumen de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0, usando una membrana de PES de 100 kDa de MWCO. La filtración final del conjugado purificado se realiza usando una membrana de 0,2 micrómetros y el conjugado se almacena a 1 - 5 °C.

5 **3. Preparación de conjugados de grupo W-135 e Y**

El polisacárido capsular purificado de grupo W-135 se disuelve en tampón acetato de sodio hasta una concentración diana de 10 mg/ml. La solución se mezcla hasta que se disuelve. La solución de polisacárido se calienta hasta 50 - 70 °C usando un intercambiador de calor encamisado. El pH se ajusta hasta 4,5. La reacción (figura 4A, etapa 1) se deja mezclar hasta que el tamaño molecular medio es de 150 000 dalton, como se determina por HPSEC. La mezcla de reacción se enfriá hasta 1-5 °C. Se añade metaperyodato de sodio a la solución de polisacárido, de modo que la concentración diana de metaperyodato sea 2 mM (figura 4A, etapa 2). El pH se ajusta hasta 6,0 y la solución se mezcla durante 60 minutos entre 0 y 5 °C. El peryodato oxida y escinde en posiciones de diol adyacentes, dando aldehídos, por ejemplo, en la posición 7 de un residuo de ácido siálico como se muestra en la figura 4A. La actividad reductora (que refleja la cantidad de aldehídos) es de 60 a 150 nmol/mg de polisacárido. La reacción se interrumpe añadiendo 0,5 ml de glicerol por gramo de polisacárido y mezclando durante un mínimo de 5 minutos. El polisacárido se concentra por ultrafiltración usando un filtro de celulosa regenerado de 10 kDa de MWCO y después se diafiltra frente a 10 intercambios de volumen de tampón acetato de sodio 50 mM, pH 6,0. El material se concentra más hasta una concentración diana de 50 mg/ml. El polisacárido despolimerizado/activado se filtra y se almacena a 1-5 °C.

20 La proteína toxoide tetánico purificada se concentra en una membrana de PES de 10 kDa de MWCO hasta una concentración final diana de hasta 100 mg/ml y después se pasa a través de un filtro de 0,2 micrómetros y se almacena a 1-5 °C. El polisacárido despolimerizado/activado y la proteína tetánica concentrada se mezclan juntos en una relación en masa de 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 o 5:1 (polisacárido:proteína). Se añade una alícuota de 100 mg/ml de cianoborohidruro de sodio en tampón fosfato 2,0 M a la mezcla de polisacárido-proteína, de modo que el cianoborohidruro de sodio es de 10 mg/ml y el tampón fosfato es de 200 mM, pH 9,0. Se añade solución salina para ajustar la concentración diana, por ejemplo, hasta una diana de 15-50 mg/ml para polisacárido. La reacción (figura 4B) se mezcla a temperatura ambiente durante una noche.

30 La reacción se diluye 1:2 con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 6 mM. Se añade una alícuota de 100 mg/ml de borohidruro de sodio en PBS 6 mM a la mezcla de reacción para obtener una diana de 0,5 mg de borohidruro de sodio por ml de volumen de reacción. La reacción se mezcla durante un mínimo de 15 minutos a temperatura ambiente. El borohidruro de sodio cubre los aldehídos sin reaccionar reduciéndolos a alcoholes. Los productos se muestran en la figura 4C y la figura 3.

35 Se añade sulfato de amonio a la reacción de conjugado para producir una concentración de sulfato de amonio 1 M. El pH se ajusta a 7 y se mezcla hasta que se disuelve a temperatura ambiente. La mezcla de reacción de conjugado se aplica a una columna de HIC compactada con resina de fenilo. El polisacárido no conjugado se eluye con 2 a 7 volúmenes de columna de solución de sulfato de amonio 1 M. El conjugado se eluye con WFI. El eluido de conjugado 40 se diafiltra frente a 10 intercambios de volumen de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0, usando una membrana de PES de 100 kDa de MWCO. La filtración final del conjugado purificado se realiza usando una membrana de 0,2 micrómetros y el conjugado se almacena a 1 - 5 °C. Puede usarse el mismo proceso para polisacárido capsular purificado de grupo Y.

45 **4. Formulación de vacunas tetravalentes**

Ejemplo 4A

50 Se formula una vacuna tetravalente de conjugado MenACYW-TT a partir de los 4 conjugados monovalentes de PS-proteína preparados como se describe en los ejemplos 1A, 2A y 3-4 y se diluye en una solución salina tamponada con acetato de sodio hasta concentración final de 10 µg de PS/serogrupo/0,5 ml. Es decir, una dosis de 0,5 ml de vacuna de conjugado MenACYW contiene 10 µg de cada uno de los PS meningocócicos de serogrupos A, C, Y y W-135, conjugados con 45 a 80 µg en total de proteína toxoide tetánico (la cantidad real de proteína toxoide tetánico depende de las relaciones particulares de PS-a-proteína de los lotes a granel de concentrado monovalente usados en las formulaciones).

Cada dosis de 0,5 ml de vacuna de conjugado MenACYW se formula en una solución salina tamponada con acetato de sodio 30 mM a pH 6,0.

Ejemplo 4B

65 Se formula una vacuna tetravalente de conjugado MenACYW-TT a partir de los 4 conjugados monovalentes de PS-proteína preparados como se describe en los ejemplos 1A, 2B y 3-4 y se diluye en una solución salina tamponada con acetato de sodio hasta concentración final de 10 µg de PS/serogrupo/0,5 ml. Es decir, una dosis de 0,5 ml de vacuna de conjugado MenACYW contiene 10 µg de cada uno de los PS meningocócicos de serogrupos A, C, Y y W-135, conjugados con 45 a 80 µg en total de proteína toxoide tetánico (la cantidad real de proteína toxoide tetánico depende

de la relaciones particulares de PS-a-proteína de los lotes a granel de concentrado monovalente usados en las formulaciones).

5 Cada dosis de 0,5 ml de vacuna de conjugado MenACYW se formula en una solución salina tamponada con acetato de sodio 30 mM a pH 6,0.

Ejemplo 4C

10 Se formula una vacuna tetravalente de conjugado MenACYW-TT a partir de los 4 conjugados monovalentes de PS-proteína preparados como se describe en los ejemplos 1B, 2B y 3-4 y se diluye en una solución salina tamponada con acetato de sodio hasta concentración final de 10 µg de PS/serogrupo/0,5 ml. Es decir, una dosis de 0,5 ml de vacuna de conjugado MenACYW contiene 10 µg de cada uno de los PS meningocócicos de serogrupos A, C, Y y W-135, conjugados con 45 a 80 µg en total de proteína toxoide tetánico (la cantidad real de proteína toxoide tetánico depende de la relaciones particulares de PS-a-proteína de los lotes a granel de concentrado monovalente usados en las formulaciones).

15 Cada dosis de 0,5 ml de vacuna de conjugado MenACYW se formula en una solución salina tamponada con acetato de sodio 30 mM a pH 6,0.

20 **5. Propiedades e inmunogenia de conjugados ejemplares**

25 Se preparó un conjugado MenA en general como se describe anteriormente sin un conector de ADH, excepto que la concentración de polisacárido usada en la reacción de conjugación con toxoide tetánico fue 12 mg/ml. El conjugado tenía una relación en masa de 0,3 de polisacárido/proteína (PS/PR). El nivel de O-acetilación se determinó en 3,0 µmol/mg de polisacárido.

30 Se preparó un conjugado MenA en general como se describe anteriormente con un conector de ADH, excepto que la concentración de polisacárido usada en la reacción de conjugación con toxoide tetánico fue 12 mg/ml. El conjugado tenía una relación en masa de 1,0 de PS/PR. El nivel de O-acetilación se determinó en 2,8 µmol/mg de polisacárido.

35 Se prepararon varios lotes adicionales del conjugado MenA con un conector de ADH en que la concentración de polisacárido usada en la reacción de conjugación con toxoide tetánico era 12 mg/ml o 16 mg/ml. Los valores medidos de las relaciones en masa de PS/PR para estos lotes fueron 1,0, 1,1, 1,2 y 1,3, y los valores medidos de niveles de O-acetilación en µmol/mg de polisacárido fueron 2,5, 2,8, 2,9 y 3,0. Algunos valores se observaron más de una vez.

40 Se confirmó que cada uno de los lotes de conjugado MenA era inmunógeno (es decir, provocaba anticuerpos anti-MenA, medidos por un ensayo bactericida en suero y/o ELISA en al menos una fracción sustancial y estadísticamente significativa de destinatarios con respecto a muestras antes del tratamiento y/o controles no inmunizados) cuando se administraba en una formulación tetravalente a sujetos humanos, ratones y/o cobayas nulitratados con vacuna contra MenA.

45 Se preparó un conjugado MenC en general como se describe anteriormente. El conjugado tenía una relación en masa de 0,6 de polisacárido/proteína (PS/PR). El nivel de O-acetilación se determinó en 2,4 µmol/mg de polisacárido. Se prepararon varios lotes adicionales del conjugado MenC. Los valores medidos de relaciones en masa de PS/PR para estos lotes fueron 0,4, 0,6 y 0,7, y los valores medidos de niveles de O-acetilación en µmol/mg de polisacárido fueron 0,8, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2,2 y 2,3. Algunos valores se observaron más de una vez.

50 Se confirmó que cada uno de los lotes de conjugado MenC era inmunógeno (es decir, provocaba anticuerpos anti-MenC, medidos por un ensayo bactericida en suero y/o ELISA en al menos una fracción sustancial y estadísticamente significativa de destinatarios con respecto a muestras antes del tratamiento y/o controles no inmunizados) cuando se administraba en una formulación tetravalente a sujetos humanos, ratones y/o cobayas nulitratados con vacuna contra MenC.

55 Se preparó un conjugado MenW-135 en general como se describe anteriormente. El conjugado tenía una relación en masa de 0,9 de polisacárido/proteína (PS/PR). El nivel de O-acetilación se determinó en 1,6 µmol/mg de polisacárido. Se prepararon varios lotes adicionales del conjugado MenW-135. Los valores medidos de las relaciones en masa de PS/PR para estos lotes fueron 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 y 1,2, y los valores medidos de niveles de O-acetilación en µmol/mg de polisacárido fueron 0,7, 0,8 y 1,3. Algunos valores se observaron más de una vez.

60 Se confirmó que cada uno de los lotes de conjugado MenW-135 era inmunógeno (es decir, provocaba anticuerpos anti-MenW-135, medidos por un ensayo bactericida en suero y/o ELISA en al menos una fracción sustancial y estadísticamente significativa de destinatarios con respecto a muestras antes del tratamiento y/o controles no inmunizados) cuando se administraba en una formulación tetravalente a sujetos humanos, ratones y/o cobayas nulitratados con vacuna contra MenW-135.

65 Se preparó un conjugado MenY en general como se describe anteriormente. El conjugado tenía una relación en masa de 1,0 de polisacárido/proteína (PS/PR). El nivel de O-acetilación se determinó en 1,3 µmol/mg de polisacárido. Se

prepararon varios lotes adicionales del conjugado MenY. Los valores medidos de las relaciones en masa de PS/PR para estos lotes fueron 0,6, 0,7, 0,8 y 0,9, y los valores medidos de niveles de O-acetilación en μ mol/mg de polisacárido fueron 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 y 1,3. Algunos valores se observaron más de una vez.

5 Se confirmó que cada uno de los lotes de conjugado MenY era inmunógeno (es decir, provocaba anticuerpos anti-MenY, medidos por un ensayo bactericida en suero y/o ELISA en al menos una fracción sustancial y estadísticamente significativa de destinatarios con respecto a muestras antes del tratamiento y/o controles no inmunizados) cuando se administraba en una formulación tetravalente a sujetos humanos, ratones y/o cobayas nulitratados con vacuna contra MenY.

10 Todos los lotes de conjugado descritos anteriormente fueron poblaciones de moléculas de conjugado que tenían un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 300 a 1500 kDa.

6. Ensayos clínicos

15 Se usó una conjugado tetravalente MenACYW-TT como se describe en este documento en estudios clínicos para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de diferentes programas de vacunación en lactantes y niños pequeños (6 semanas de edad y mayores) y adultos con edades de 56 años y mayores.

20 a) Ensayo clínico 1 en fase I/II - Seguridad e inmunogenicidad de diversas formulaciones similares a MenACYW-TT administradas a niños pequeños sanos nulitratados con vacuna meningocócica (12 meses +/- 21 días)

Este estudio en fase I/II evaluó la seguridad e inmunogenicidad de una sola dosis de diversas formulaciones tetravalentes de polisacárido meningocócico-toxoides tetánicos relacionadas con MenACYW-TT administrado por vía intramuscular a niños pequeños con edades de 12 meses +/- 21 días (grupos 1-5). Se administró NeisVac-C® (conjugado de polisacárido meningocócico de grupo C completamente des-O-acetilado-toxoides tetánicos, denominado en este documento "MenC-TT", una vacuna monovalente de conjugado meningocócico autorizado) a un grupo de control (grupo 6).

30 La formulación 1A contenía 4 μ g de polisacárido de cada uno de los cuatro polisacáridos (es decir, MenACYW) y 22,1 μ g de TT por dosis de 0,5 ml. Todos tenían niveles de O-acetilación naturales y se conjugaron mediante activación con peryodato y aminación reductora (MenCYW) o usando carbonildiimidazol y dihidrazida de ácido adípico (MenA) esencialmente como se describe anteriormente.

35 La formulación 1B contenía 10 μ g de cada uno de polisacárido MenA y MenW y 4 μ g de cada uno de polisacárido MenC y MenY y 36,6 μ g de TT por dosis de 0,5 ml. Por lo demás era idéntica a la formulación 1A.

La formulación 1C contenía 10 μ g de cada uno de los cuatro polisacáridos y 54,8 μ g de TT por dosis de 0,5 ml. Por lo demás era idéntica a la formulación 1A.

40 La formulación 2A contenía 4 μ g de polisacárido de cada uno de los cuatro polisacáridos y 33,9 μ g de TT por dosis de 0,5 ml. Los polisacáridos MenC, Y y W se des-O-acetilaron parcialmente por tratamiento alcalino, y se conjugaron mediante activación con peryodato y aminación reductora esencialmente como se describe anteriormente. El polisacárido MenA tenía un nivel de O-acetilación natural y se preparó como un neoglucoconjunto usando química de conjugación esencialmente como se describe en el documento US2005/0002957 ejemplo 5.

45 La formulación 2B contenía 10 μ g de cada uno de los cuatro polisacáridos y 84,8 μ g de TT por dosis de 0,5 ml. Por lo demás era idéntica a la formulación 2A.

50 Todas las formulaciones anteriores contenían un 0,67 % de NaCl y se tamponaron con fosfato de sodio a pH 6.

Los seis grupos de estudio se resumen y caracterizan en la tabla 1.

Tabla 1: Grupos de estudio para ensayo clínico 1 en fase I/II

Grupo	n	Tratamiento	Población de análisis según protocolo
1	63	Formulación 1A	54
2	61	Formulación 1B	51
3	61	Formulación 1C	51
4	60	Formulación 2A	48
5	61	Formulación 2B	51
6	62	MenC-TT	51

- 5 Dentro de los grupos de tratamiento, las relaciones de sexo masculino a femenino variaron, siendo los extremos de un 39,3 % a un 60,7 % en el grupo 2, y de un 62,3 % a un 37,7 % en el grupo 5. El intervalo de edad en todos los grupos fue de 11,0 a 12,0 meses; entre los grupos, la media varió de 11,5 a 11,7 meses.
- 10 Se recogieron datos de seguridad como acontecimientos adversos (AA) no declarados hasta 30-37 días después de la dosis de vacuna. El intervalo para AA declarados fue entre D0 y D7 (es decir, de 0 a 7 días después de la administración). La recogida de reactogenia declarada incluyó dolorimiento, eritema e hinchazón en el sitio de inyección, así como fiebre, vómitos, pérdida de apetito, llanto anómalo, somnolencia e irritabilidad.
- 15 Todos los sujetos vacunados completaron el estudio, pero 56 sujetos vacunados (todos los grupos) se excluyeron del análisis por desviaciones del protocolo, siendo la razón más común incapacidad de proporcionar la muestra de sangre del día 30-37 dentro de la ventana de tiempo permitida.
- 20 15 Dos sujetos experimentaron AA no declarados inmediatos, de los que uno se consideró relacionado con la vacunación (incidencia de exantema en un sujeto del grupo 1).
- 25 20 Reacciones en el sitio de inyección declaradas entre el día 0 y día 7: La mayoría de sujetos en todos los grupos experimentaron reacciones declaradas. Globalmente, las tasas de reacciones declaradas fueron comparable entre los grupos. El porcentaje de destinatarios del grupo 1-5 que presentaron reacción en el sitio de inyección fue similar al observado con sujetos que recibieron la vacuna de control (grupo 6).
- 30 25 No hubo correlación aparente entre las tasas de reacciones en el sitio de inyección y la cantidad de toxoide tetánico contenida en cada formulación de vacuna.
- 35 30 La reacción en el sitio de inyección más común fue dolorimiento, con tasas que varían de un 25,4 % en el grupo 1 a un 39,3 % en el grupo 5; la siguiente fue eritema, que varió de un 29,5 % en el grupo 2 a un 39,3 % en el grupo 5; y la reacción menos común fue hinchazón, que varió de un 13,6 % en el grupo 4 a un 23,0 % en el grupo 3. La mayoría de reacciones declaradas en el sitio de inyección fueron de intensidad de grado 1, comenzaron y se resolvieron en 3 días desde la vacunación, y no requirieron ninguna intervención. No hubo tendencias de grupo en términos de intensidad, tiempo de aparición, duración o acción emprendida.
- 40 35 Reacciones sistémicas declaradas entre el día 0 y el día 7: Como con las reacciones en el sitio de inyección, las tasas globales de reacciones sistémicas tales como fiebre, vómitos, llanto anómalo, somnolencia, pérdida de apetito e irritabilidad fueron comparables entre los grupos 1-5 y similares a las observadas con la vacuna de control. La reacción sistémica más común en todos los grupos fue irritabilidad, que varió de un 54,2 % en el grupo 4 a un 70,5 % tanto en el grupo 2 como el grupo 5. El siguiente más común (para todos, salvo el grupo 2) fue llanto anómalo, que varió de un 34,4 % en el grupo 2 a un 48,4 % en el grupo 6, seguido de pérdida de apetito (que fue la segunda reacción más común en el grupo 2), que varió de un 27,9 % en el grupo 6 a un 46,8 % en el grupo 6. Las tasas de vómitos variaron de un 18,6 % en el grupo 4 a un 32,3 % en el grupo 6; y la fiebre fue la reacción menos presentada, que varió de un 11,1 % en el grupo 1 a un 25,8 % en el grupo 6. La mayoría de reacciones sistémicas declaradas fueron de intensidad de grado 1, comenzaron y se resolvieron en 3 días desde la vacunación, y no requirieron ninguna intervención. No hubo tendencias de grupo en términos de intensidad, tiempo de aparición, duración o acción emprendida.
- 45 40 Acontecimiento adversos no declarados entre el día 0 y el día 30: Se informó de un total de 931 AA no declarados en 327 sujetos. Un total de 107 AA no declarados se consideraron relacionados con la vacunación y se identificaron como reacciones adversas (RA). Las RA más comunes fueron en los SOC de 1) trastornos generales y condiciones del sitio de administración (25); 2) infecciones e infestaciones y trastornos de la piel y el tejido subcutáneo (20 cada uno), y; y 3) trastornos gastrointestinales y trastornos respiratorios, torácicos y mediastinales (16 cada uno). No hubo asociaciones aparentes entre el número de AR y la vacuna recibida. Se informó de un total de 4 RA sistémicas como intensidad de grado 3: 1 en cada de los grupos 1 y 4, y 2 en el grupo 5.
- 55 45 AA graves: No se produjeron muertes. Se produjo un total de 7 AAG en 7 sujetos durante el estudio: 2 sujetos en el grupo 1, 1 sujeto en el grupo 2, 2 sujetos en el grupo 3 y 2 sujetos en el grupo 4. No se informaron AAG en los grupos 5 y 6. Uno de estos AAG, artritis reactiva experimentada por un sujeto en el grupo 3, se consideró relacionada con la vacunación. El sujeto se recuperó completamente 23 días después.
- 60 55 Las conclusiones con respecto a la seguridad fueron que la dosis individual se toleraba bien en todos los grupos y no había diferencias significativas en el perfil de seguridad.
- 65 60 Se midieron los anticuerpos funcionales contra los serogrupos meningocócicos A, C, Y y W-135 por ensayo bactericida en suero usando complemento humano (SBA-HC) y complemento de cría de conejo (SBA-BR) para determinar 1) la proporción de sujetos con una concentración de SBA-HC $\geq 1:8$ y $\geq 1:4$, o una concentración de SBA-BR $\geq 1:8$; 2) medias geométricas de las concentraciones (GMT); 3) curvas inversas de distribución acumulativa (RCDC); y 4) distribución de concentraciones. Además, las concentraciones de anticuerpo contra el toxoide tetánico presentes en las vacunas

se ensayaron por ELISA. Los ensayos se realizaron en muestras de sangre recogidas antes de la vacunación ("previo" en las tablas 2 y 3) y 30-37 días después de la vacunación ("posterior" en las tablas 2 y 3).

5 Las tablas 2 y 3 muestran los resultados de SBA-HC. En las tablas 2 y 3, los intervalos de confianza del 95 % son porcentajes.

Tabla 2: Número y porcentaje de sujetos con una concentración $\geq 1:8$ al inicio y después de la vacunación, ensayo de SBA-HC (población según protocolo)

Serogrupo	Punto temporal	Grupo 1 (N = 54)	Grupo 2 (N = 51)	Grupo 3 (N = 51)	Grupo 4 (N = 48)	Grupo 5 (N = 51)	Grupo 6 (N = 51)
		n/M; % IC 95 %	n/M; % IC 95 %	n/M; % IC 95 %	n/M; % IC 95 %	n/M; % IC 95 %	n/M; % IC 95 %
A	Previo	19/54; 35,2 (22,7; 49,4)	11/51; 21,6 (11,3; 35,3)	15/50; 30,0 (17,9; 44,6)	9/48; 18,8 (8,9; 32,6)	16/51; 31,4 (19,1; 45,9)	13/51; 25,5 (14,3; 39,6)
	Posterior	47/54; 87,0 (75,1; 94,6)	50/50; 100,0 (92,9; 100,0)	45/51; 88,2 (76,1; 95,6)	36/48; 75,0 (60,4; 86,4)	47/51; 92,2 (81,1; 97,8)	23/50; 46,0 (31,8; 60,7)
C	Previo	0/54; 0,0 (0,0; 6,6)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)	1/48; 2,1 (0,1; 11,1)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)
	Posterior	49/54; 90,7 (79,7; 96,9)	44/51; 86,3 (73,7; 94,3)	43/51; 84,3 (71,4; 93,0)	45/48; 93,8 (82,8; 98,7)	49/51; 96,1 (86,5; 99,5)	51/51; 100,0 (93,0; 100,0)
Y	Previo	1/54; 1,9 (0,0; 9,9)	2/51; 3,9 (0,5; 13,5)	1/51; 2,0 (0,0; 10,4)	0/48; 0,0 (0,0; 7,4)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)	3/51; 5,9 (1,2; 16,2)
	Posterior	36/54; 66,7 (52,5; 78,9)	40/51; 78,4 (64,7; 88,7)	40/51; 78,4 (64,7; 88,7)	44/48; 91,7 (80,0; 97,7)	42/51; 82,4 (69,1; 91,6)	4/51; 7,8 (2,2; 18,9)
W-135	Previo	0/54; 0,0 (0,0; 6,6)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)	0/48; 0,0 (0,0; 7,4)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)
	Posterior	35/54; 64,8 (50,6; 77,3)	35/50; 70,0 (55,4; 82,1)	33/51; 64,7 (50,1; 77,6)	30/48; 62,5 (47,4; 76,0)	36/51; 70,6 (56,2; 82,5)	1/50; 2,0 (0,1; 10,6)

Tabla 3: Medias geométricas de las concentraciones (GMT) al inicio y después de la vacunación, ensayo de SBA-HC (población según protocolo)

Antígeno	Punto temporal	Grupo 1 (N = 54)	Grupo 2 (N = 51)	Grupo 3 (N = 51)	Grupo 4 (N = 48)	Grupo 5 (N = 51)	Grupo 6 (N = 51)
		GMT (IC 95 %)	GMT (IC 95 %)	GMT (IC 95 %)	GMT (IC 95 %)	GMT (IC 95 %)	GMT (IC 95 %)
A	Previo	4,79 (3,75; 6,11)	3,84 (3,12; 4,73)	4,17 (3,35; 5,19)	3,83 (3,07; 4,78)	4,77 (3,59; 6,35)	3,84 (3,11; 4,74)
	Posterior	21,22 (14,85; 30,33)	41,64 (30,30; 57,24)	29,10 (20,18; 41,95)	14,89 (10,54; 21,03)	29,10 (21,30; 39,75)	6,87 (5,10; 9,26)
C	Previo	2,00 (2,00; 2,00)	2,03 (1,97; 2,08)	2,03 (1,97; 2,08)	2,06 (1,94; 2,18)	2,00 (2,00; 2,00)	2,08 (1,99; 2,18)
	Posterior	60,80 (37,71; 98,01)	46,19 (29,29; 72,82)	73,32 (42,18; 127,43)	131,75 (80,90; 214,56)	252,54 (170,84; 373,32)	471,91 (373,90; 595,60)
Y	Previo	2,08 (1,96; 2,20)	2,14 (1,94; 2,36)	2,20 (1,86; 2,60)	2,00 (2,00; 2,00)	2,00 (2,00; 2,00)	2,32 (1,96; 2,76)
	Posterior	13,89 (9,19; 21,00)	17,36 (11,50; 26,21)	23,73 (14,86; 37,90)	26,52 (18,61; 37,79)	26,46 (17,29; 40,49)	2,42 (2,09; 2,80)
W-135	Previo	2,03 (1,97; 2,08)	2,00 (2,00; 2,00)	2,03 (1,97; 2,08)	2,03 (1,97; 2,09)	2,03 (1,97; 2,08)	2,00 (2,00; 2,00)

Tabla 3: Medias geométricas de las concentraciones (GMT) al inicio y después de la vacunación, ensayo de SBA-HC (población según protocolo)

Antígeno	Punto temporal	Grupo 1 (N = 54)	Grupo 2 (N = 51)	Grupo 3 (N = 51)	Grupo 4 (N = 48)	Grupo 5 (N = 51)	Grupo 6 (N = 51)
		GMT (IC 95 %)	GMT (IC 95 %)				
	Posterior	10,21 (7,32; 14,25)	13,00 (8,59; 19,66)	16,00 (9,74; 26,28)	10,53 (7,10; 15,60)	15,57 (10,56; 22,95)	2,17 (2,01; 2,34)

Como puede observarse a partir de las tablas, las concentraciones antes de la vacunación fueron bajas para todos los serogrupos. Para el serogrupo A, la mayoría de sujetos en todos los grupos obtuvieron concentraciones de 8 o menos; para los otros tres serogrupos, casi todos los sujetos obtuvieron valores <4. En los grupos 1-5 después de la vacunación, para el serogrupo A, la mayoría de valores de concentración estuvieron entre 8 y 128; para el serogrupo C, entre 16 y 1024; para el serogrupo Y, entre <4 y 128; y para el serogrupo W-135, entre <4 y 64. Para el grupo de control, los valores para los serogrupos A, Y y W-135 fueron principalmente entre <4 y 4, mientras que para el serogrupo C, la mayoría de valores estuvieron entre 256 y 1024. Hubo una tendencia hacia mayores respuestas de anticuerpo en los grupos de dosis elevada en comparación con los grupos de dosis baja.

En los ensayos de SBA-BR, las GMT antes de la dosis fueron comparables entre los grupos de tratamiento, que varían de 4,22 a 5,26 para el serogrupo A; de 4,00 a 6,26 para el serogrupo C; y de 6,01 a 8,45 para el serogrupo W-135. No se observó más variabilidad en el serogrupo Y, cuyos valores variaron de 17,36 (grupo 5) a 35,92 (grupo 1).

En los grupos 1-5, los valores después de la vacunación variaron de 336,91 (grupo 1) a 759,35 (grupo 5) para el serogrupo A; el valor para el grupo de control fue 5,66. Los valores para el serogrupo C variaron de 145,53 (grupo 1) a 636,37 (grupo 5). El valor para el grupo de control fue 1290,16. Los valores para el serogrupo Y variaron de 586,54 (grupo 3) a 713,70 (grupo 4). El valor para el grupo de control fue 23,41. Los valores para el serogrupo W-135 variaron de 912,28 (grupo 4) a 1518,71 (grupo 5). El valor para el grupo de control fue 8,57.

b) Ensayo clínico 1 en fase II - Seguridad e inmunogenia de MenACYW-TT en lactantes y niños pequeños

Se realizó un ensayo clínico en fase II, aleatorizado, sin enmascaramiento, multicéntrico en 580 niños en los Estados Unidos. El ensayo se diseñó para estudiar los perfiles de seguridad e inmunogenia de la vacuna MenACYW-TT administrada a diferentes programas y simultáneamente con vacunaciones pediátricas de rutina. El estudio también tenía como objetivo describir los perfiles de inmunogenia de la vacuna MenACYW-TT y las vacunas pediátricas aprobadas seleccionadas (Pentace® (DTaP-IPV/Hib), Prevnar® (PCV7) o Prevnar® 13 (PCV13), M-M-R® II (MMR) Varivax® (V), ENGERIX-B® o RECOMBIVAX HB® (HepB), Rotarix® (RV1), y Rotateq® (RV5) cuando se administraban simultáneamente con la vacuna MenACYW-TT.

Los participantes recibieron vacuna MenACYW-TT simultáneamente con vacunas de rutina (grupos de investigación; grupos 1-5 de la tabla 1) o solo recibieron vacunas pediátricas de rutina (grupos de control; grupos 6-7).

Lactantes de dos meses de edad se asignaron aleatoriamente a 3 grupos de investigación (grupos 1-3) y 2 grupos de control (grupos 6 y 7), como se muestra en la tabla 1. Los lactantes en los grupos de investigación 1-3 recibieron 3 o 4 dosis de vacuna MenACYW-TT (simultáneamente con vacunas de rutina) como se describe en la tabla 4.

La **tabla 4** proporciona un resumen del diseño del ensayo clínico.

Tabla 4: Diseño del estudio y vacunas recibidas en este ensayo clínico

Programa del ensayo (edad)					
Grupo	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
1	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV1 o RV5, HepB ¹	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV1 o RV5	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV5 ² , HepB	MenACYW-TT, MMR, V, PCV7 o PCV13	
2	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV1 o RV5, HepB ¹	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV1 o RV5	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV5 ² , HepB	MMR, V, PCV7 o PCV13	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib

Tabla 4: Diseño del estudio y vacunas recibidas en este ensayo clínico

		Programa del ensayo (edad)				
Grupo	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	
3	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV1 o RV5, HepB ¹	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV1 o RV5	DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV5 ² , HepB	MenACYW-TT, MMR, V, PCV7 o PCV13		
4			MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV5 ² , HepB	MenACYW-TT, MMR, V, PCV7 o PCV13		
5				MenACYW-TT, MMR, V, PCV7 o PCV13		
6	DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV1 o RV5, HepB ¹	DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV1 o RV5	DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV5 ² , HepB	MMR, V, PCV7 o PCV13		
7	DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV1 o RV5, HepB ¹	DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV1 o RV5	DTaP-IPV/Hib, PCV7 o PCV13, RV5 ² , HepB	MMR, V, PCV7 o PCV13	DTaP-IPV/Hib	

¹Si se administra solamente una dosis previa; ²Si hay vacunaciones previas con RV5

También se incluyeron lactantes de seis meses de edad que recibieron 2 dosis de vacuna MenACYW-TT (simultáneamente con vacunas de rutina) a los 6 y 12 meses de edad (grupo 4), y de 12 meses de edad que recibieron 1 dosis de vacuna MenACYW-TT (simultáneamente con vacunas de rutina) a los 12 meses de edad (grupo 5).

- 5 Se usaron ensayos bactericidas en suero con complemento humano (hSBA) y de cría de conejo (rSBA) para medir los anticuerpos contra los serogrupos meningocócicos A, C, Y y W al inicio y 30 días después de las últimas dosis en los lactantes y los niños pequeños. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) de ambos ensayos fue 1:4. Véase, por ejemplo, Maslanka *et al.*, Standardization and a Multilaboratory Comparison of *Neisseria meningitidis* Serogroup A and C Serum Bactericidal Assays, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Mar. 1997, pág. 156-167, y Goldschneider Gotschlich, y Artenstein, Immunity to Meningococcus, The Role of Humoral Antibodies, the Journal of Experimental Medicine, 1969.
- 10 15 Se recogieron datos de seguridad hasta 6 meses después de la última dosis de las vacunas. El intervalo para acontecimientos adversos (AA) declarados fue entre D0 y D7 (es decir, de 0 a 7 días después de la administración). La recogida de la reactogenia declarada incluyó medición diaria de la temperatura corporal y eritema e hinchazón en el sitio de inyección, así como registro de la intensidad para el dolor en el sitio de inyección, cefalea, mialgia y malestar. También se recogieron los AA no declarados y los acontecimientos adversos graves (AAG) durante todo el estudio. Todos los análisis estadísticos fueron descriptivos.
- 20 25 30 35 Se analizaron los datos demográficos para el conjunto de análisis de seguridad, que se definió como los sujetos que recibieron al menos una dosis de vacuna de estudio o control y para los que estaban disponibles datos de seguridad. La media de edad en el momento de la inclusión en el estudio en los grupos 1, 2, 3, 6 y 7 fue 2,19, 2,20, 2,24, 2,18 y 2,20 meses, respectivamente. El intervalo de edad fue de 1,57 a 2,97 meses en el grupo 1, de 1,57 a 2,90 meses en el grupo 2, de 1,53 a 3,00 meses en el grupo 3, de 1,53 a 2,87 meses en el grupo 6 y de 1,70 a 2,97 meses en el grupo 7 (criterios de inclusión de 2 meses [de 42 a 89 días]). En el grupo 4, la media de edad fue 6,23 meses y el intervalo de edad fue de 5,63 meses a 6,50 meses (criterio de inclusión de 6 meses [180 días ± 14 días]). En el grupo 5, la media de edad fue 12,4 meses y el intervalo de edad fue de 12,2 a 12,7 meses (criterio de inclusión de 12 meses [365 días + 14 días]).
- Después de completa la serie de lactantes y de recibir una dosis de vacuna MenACYW-TT adicional en el segundo año de vida (grupos 1-4), la mayoría de participantes en el estudio consiguieron concentraciones protectoras de 1:8 (91 %-100 % para complemento humano [hSBA] y 80 %-100 % para complemento de cría de conejo [rSBA]) para los 4 serogrupos (ACYW) incluidos en la vacuna MenACYW-TT, independientemente del número de dosis recibidas durante el primer año de vida. Para participantes que recibieron una sola dosis a los 12 meses de edad (grupo 5), las concentraciones protectoras de ACYW de 1:8 fueron entre un 47,5 %-90 % (hSBA) y un 62 %-100 % (rSBA). Por tanto, la vacuna de conjugado MenACYW-TT demuestra una respuesta inmunógena robusta después de una dosis adicional en el segundo año de vida, independientemente del programa principal recibido en el primer año de vida.

La **figura 6** proporciona el porcentaje de sujetos con niveles de hSBA mayores de o iguales a 1:8 para cada serotipo A, C, Y y W para los grupos 1-4. La **figura 7** proporciona resultados de rSBA similares para estos mismos grupos.

- 5 Las respuestas inmunitarias a hSBA después de una sola dosis de vacuna MenACYW-TT administrada a los 12 meses de edad (grupo 5) fueron similares a las respuestas observadas en la serie de 3 dosis (grupo 3) para serogrupo C (90 %), pero inferiores para serogrupo Y (47,5 %), A (75 %) y W-135 (54 %). Véase la tabla 5, que muestra las concentraciones de hSBA y rSBA para sujetos que recibieron una sola dosis de vacuna MenACYW-TT a los 12 meses de edad (grupo 5).

Tabla 5. Porcentaje de sujetos que consiguen concentraciones de hSBA y rSBA $\geq 1:8$ en D30 después de vacuna MenACYW-TT (sujetos que solamente recibieron una dosis en el segundo año de vida)

Serogrupo	Porcentaje de sujetos que consiguen concentraciones en ensayo bactericida en suero $\geq 1:8$	Complemento humano (hSBA) % (IC 95 %)	Complemento de cría de conejo (rSBA) % (IC 95 %)
A	74,6 (61,6; 85,0)	62,1 (48,4; 74,5)	
C	90,2 (79,8; 96,3)	91,4 (81,0; 97,1)	
Y	47,5 (34,6; 60,7)	94,8 (85,6; 98,9)	
W	54,2 (40,8; 67,3)	100,0 (93,8; 100,0)	

D: día; IC: intervalo de confianza

- 10
- No hubo evidencias de interferencia con las vacunas pediátricas de rutina administradas simultáneamente con la vacuna MenACYW-TT (datos no mostrados).
- 15 La frecuencia de reacciones declaradas en el sitio de inyección no aumentó con dosis repetidas de la vacuna. Véase, la **figura 8**, que presenta el porcentaje acumulativo de participantes que informaron de una o más reacciones declaradas en el sitio de inyección en 7 días desde la administración de vacuna MenACYW-TT. El porcentaje acumulativo de participantes que informaron ≥ 1 reacción declarada en el sitio de inyección en 7 días después de la administración de la vacuna MenACYW-TT fue el más alto en los grupos que recibieron 4 dosis (grupos 1 y 2, 80,0 %; 80,8 %), seguido de los grupos que recibieron 2 dosis (grupo 4, 75,3 %) o 3 dosis (grupo 2, 74,0 %), y fue el más bajo en el grupo que recibió 1 dosis (grupo 5, 57,4 %).
- 20 La **figura 9** muestra las reacciones sistémicas declaradas en 7 días desde la administración de vacuna MenACYW-TT más vacunas de rutina o solo vacunas de rutina.
- 25 La mayoría de acontecimientos adversos no graves (AANG) se informaron después de las vacunaciones con vacuna MenACYW-TT o vacunas de rutina, y cada uno de los AANG de grado 3 informados no estaban relacionados con las vacunas del estudio. No hubo acontecimientos adversos graves relacionados con la vacuna.
- 30 Tanto la vacuna MenACYW-TT como las vacunas de rutina fueron inmunógenas cuando se administraron simultáneamente (es decir, en el mismo día, como vacunas separadas), en comparación a cuando las vacunas de rutina se administraron sin vacuna MenACYW-TT en los grupos de control, lo que indica que no había interacción negativa entre la vacuna MenACYW-TT y las vacunas de rutina.
- 35 En resumen, la vacuna MenACYW-TT fue segura y bien tolerada en lactantes y niños pequeños independientemente del programa de inmunización y el número de dosis administradas. El perfil de seguridad de la vacuna MenACYW-TT es similar globalmente al de los grupos de control, independientemente del programa de inmunización y el número de dosis administradas.
- 40 Por tanto, la vacuna MenACYW-TT de investigación se toleró bien y fue inmunógena. Todos los programas de vacunación que incluyeron una o más dosis tanto en el primero como en el segundo año de vida indujeron respuestas inmunitarias robustas para los 4 serogrupo A, C, Y y W de *N. meningitidis* de la vacuna, y estuvieron acompañadas por un perfil de seguridad aceptable.
- 45 **c) Ensayo clínico 2 en fase II - Seguridad e inmunogenicidad de MenACYW-TT administrado a adultos de 56 años de edad y mayores**

La edad y las enfermedades crónicas subyacentes son factores de riesgo importantes para enfermedad meningocócica, de modo que los adultos mayores tienen mayor riesgo. Se realizó un estudio clínico para evaluar la

seguridad y la inmunogenicidad de la vacuna MenACYW-TT en comparación con Menomune®-A/C/Y/W-135, una vacuna tetravalente aprobada de polisacárido meningocócico sencillo (MPSV4) en adultos de 56 años de edad o mayores.

- 5 Se realizó un estudio en fase II, aleatorizado, sin enmascaramiento, multicéntrico en 301 adultos sanos mayores de o de 56 años de edad en los Estados Unidos. Los participantes de 12 centros de estudio se asignaron aleatoriamente para recibir una dosis de MenACYW-TT o MPSV4 (Menomune® - A/C/Y/W-135). Los pacientes se estratificaron de acuerdo con la edad en 2 subconjuntos: 1) de 56 a 64 años y 2) mayores de o de 65 años.
- 10 Se formaron cuatro grupos de estudio como sigue. El grupo 1a (n = 101, edades de 56-64 años) y el grupo 1b (n = 100, ≥65 años) recibieron MenACYW-TT. El grupo 2a (n = 50, edades de 56-64 años) y el grupo 2b (n = 50, ≥65 años) recibieron la vacuna MPSV4. "Grupo 1" se referirá a grupo 1a más grupo 1b. "Grupo 2" se referirá a grupo 2a más grupo 2b. Los resultados demográficos se resumen en la tabla 6.

Tabla 6: Diseño del estudio y vacunas recibidas en este ensayo clínico

Grupo de estudio (número de participantes en el estudio)	Vacuna recibida (intervalo de edad de participantes en el estudio)
Grupo 1a (n = 101)	MenACYW-TT (56-64 años)
Grupo 1b (n = 100)	MenACYW-TT (≥65 años)
Grupo 2a (n = 50)	MPSV4 (56-64 años)
Grupo 2b (n = 50)	MPSV4 (≥65 años)

- 15 Se usaron ensayos bactericidas en suero (SBA) con complemento humano (hSBA) y complemento de cría de conejo (rSBA), como se describe anteriormente, para medir anticuerpos contra los serogrupos meningocócicos A, C, Y y W al inicio y 30 días después de la administración de la vacuna. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para ambos ensayos fue 1:4.
- 20 Los daños de seguridad se recogieron hasta 30 días después de la administración. El intervalo para AA declarados fue entre D0 y D7 (es decir, de 0 a 7 días después de la administración). La recogida de la reactogenia declarada incluyó medición diaria de la temperatura corporal y eritema e hinchazón en el sitio de inyección, así como registro de la intensidad para el dolor en el sitio de inyección, cefalea, mialgia y malestar. También se recogieron los AA no declarados y los acontecimientos adversos graves (AAG) durante todo el estudio. Todos los análisis estadísticos fueron descriptivos.
- 25 Se analizaron los datos demográficos para el conjunto de análisis de seguridad, que se definió como los sujetos que recibieron al menos una dosis de vacuna de estudio o control y para los que estaban disponibles datos de seguridad. En el momento de la inclusión, la edad media de los sujetos fue similar tanto en el grupo 1 como el grupo 2 ($66,1 \pm 7,13$ años, y $65,8 \pm 6,58$ años, respectivamente). Además, las edades fueron similares para los grupos que tenían sujetos de 56-64 años y los que tenían sujetos de ≥65 años ($60,3 \pm 2,52$ años en el grupo 1a, $60,8 \pm 2,59$ años en el grupo 2a, $71,9 \pm 5,28$ años en el grupo 1b, y $70,8 \pm 5,45$ años en el grupo 2b).
- 30 35 Tanto en el grupo 1 como en el grupo 2, hubo ligeramente más mujeres (60,8 % [121/199] y 55,0 % [55/100], respectivamente) que hombres (39,2 % [78/199] y 45,0 % [45/100], respectivamente). Se observó la misma tendencia en los subconjuntos, con la excepción del grupo 2b, donde hubo números iguales de mujeres y hombres (50,0 % [25/50]).
- 40 40 Los porcentajes de participantes del estudio con concentraciones de hSBA ≥1:8 contra los serogrupos A, C, Y y W-135 estuvieron notablemente aumentados en el día 30 en comparación con el valor inicial para todos los grupos. En los dos subestratos de edad (de 56 a 64 años de edad y ≥65 años de edad) los resultados fueron globalmente similares dentro de cada grupo de vacunación como se muestra en la **tabla 7**.

Tabla 7. Porcentaje de sujetos que consiguen concentraciones de hSBA ≥1:8 en D30

Serogrupos	Grupo 1a MenACYW-TT (56 años-64 años) (N = 98) % (IC 95 %)	Grupo 1b MenACYW-TT (≥65 años) (N = 97) % (IC 95 %)	Grupo 2a MPSV4 (56 años-64 años) (N = 46) % (IC 95 %)	Grupo 2b MPSV4 (≥65 años) (N = 48) % (IC 95 %)
A	95,9 (89,9; 98,9)	91,8 (84,4; 96,4)	78,3 (63,6; 89,1)	91,7 (80,0; 97,7)
C	71,4 (61,4; 80,1)	78,4 (68,8; 86,1)	58,7 (43,2; 73,0)	66,7 (51,6; 79,6)
Y	81,6 (72,5; 88,7)	79,4 (70,0; 86,9)	60,9 (45,4; 74,9)	58,3 (43,2; 72,4)

Tabla 7. Porcentaje de sujetos que consiguen concentraciones de hSBA $\geq 1:8$ en D30				
Serogrupos	Grupo 1a MenACYW-TT (56 años-64 años) (N = 98) % (IC 95 %)	Grupo 1b MenACYW-TT (≥ 65 años) (N = 97) % (IC 95 %)	Grupo 2a MPSV4 (56 años-64 años) (N = 46) % (IC 95 %)	Grupo 2b MPSV4 (≥ 65 años) (N = 48) % (IC 95 %)
W	77,6 (68,0; 85,4)	81,4 (72,3; 88,6)	58,7 (43,2; 73,0)	62,5 (47,4; 76,0)

D: día; IC: intervalo de confianza

- 5 La **figura 10** proporciona el porcentaje de sujetos que consiguen niveles de hSBA $\geq 1:8$ en D30 para el serogrupo A, C, Y y W usando datos de todos los pacientes (es decir, grupos de edad combinados). El porcentaje de individuos con concentraciones de hSBA $\geq 1:8$ después de administración de MenACYW-TT fue comparable con las concentraciones después de administración de MPSV4 para los serogrupos A y C. El porcentaje de individuos con concentraciones de hSBA $\geq 1:8$ después de la administración de MenACYW-TT fue mayor que las concentraciones después de la administración de MPSV4 para los serogrupos Y y W.
- 10 La **figura 11** proporciona la media geométrica de las concentraciones (GMT) para diferentes serogrupos en D30 para ambas vacunas. Las GMT con la MenACYW-TT fueron mayores o iguales a las GMT con MPSV4 para todos los serogrupos.
- 15 Los porcentajes de participantes con concentraciones de rSBA mayores de o iguales a 1:8 fueron comparables entre los destinatarios de MenACYW-TT y los destinatarios de MPSV4 para los cuatro grupos de vacuna. Véase, la **figura 12**.
- 20 Las reacciones declaradas en el sitio de inyección (**figura 13**) y las reacciones sistémicas declaradas (**figura 14**) en 7 días desde la administración de MenACYW-TT fueron similar a las de la vacuna MPSV4.
- 25 Globalmente, el perfil de reactogenia tanto para la vacuna MenACYW-TT como para la MPSV4 fue similar. La mayoría de acontecimientos adversos no declarados fueron de intensidad de grado 1 o grado 2. No hubo reacciones de hipersensibilidad inmediatas y ningún abandono debido a AA o AAG. No se observó aumento en la reactogenia en destinatarios de vacuna mayores. No se informaron acontecimientos adversos graves.
- 30 MenACYW-TT se toleró bien y fue inmunógena cuando se administró a adultos de 56 años de edad o mayores. Por lo tanto, MenACYW-TT representa una vacuna alternativa para la prevención de enfermedad meningocócica invasiva, incluyendo en áreas del mundo donde solo están disponibles actualmente vacunas de polisacárido sencillos, tales como MPSV4, para la inmunización de adultos mayores.
- 35 **d) Ensayo clínico 3 en fase II - Seguridad e inmunogenia de MenACYW-TT administrada a niños pequeños sanos nulitratados con vacuna meningocócica (12-23 meses)**
- 40 La vacuna de conjugado MenACYW-TT está destinada para su uso en individuos de 6 semanas de edad y mayores. Este estudio evaluó la seguridad e inmunogenia de una sola dosis en niños pequeños usando Nimenrix®, una vacuna tetravalente aprobada de conjugado meningocócico (MCV4-TT) como control.
- 45 Se realizó un estudio en fase II, aleatorizado, sin enmascaramiento en 188 niños pequeños nulitratados con vacuna meningocócica (12-23 meses de edad) en Finlandia. Los participantes se asignaron aleatoriamente para recibir una dosis de vacuna MenACYW-TT o MCV4-TT. Se usaron ensayos bactericidas en suero con complemento humano (hSBA) y de cría de conejo (rSBA) para medir los anticuerpos contra los serogrupos meningocócicos A, C, W y Y al inicio y 30 días después de la dosis. El LLOQ de ambos ensayos bactericidas fue 1:4. También se midieron las respuestas de anticuerpos contra el tétanos.
- 50 Los datos de seguridad se recogieron hasta 30 días después de la dosis. El intervalo para los acontecimientos adversos (AA) declarados fue entre D0 y D7. La recogida de la reactogenia declarada incluyó medición diaria de la temperatura corporal y eritema e hinchazón en el sitio de inyección, así como registro de la intensidad para el dolor en el sitio de inyección, cefalea, mialgia y malestar. Se recogieron los AA no declarados y los acontecimientos adversos graves (AAG) durante todo el estudio. Todos los análisis fueron descriptivos.

La **tabla 8** proporciona datos sobre el diseño del estudio y la disposición de sujetos del ensayo.

Tabla 8: Diseño del estudio y disposición de sujetos

	Vacuna de conjugado MenACYW-TT, n (%)	Vacuna de control MCV4-TT, n (%)	Todos los sujetos, n (%)
Tamaño de muestra programada	100	100	200
Sujetos incluidos	94 (100%)	94 (100%)	188 (100%)
Sujetos aleatorizados	94 (100%)	94 (100%)	188 (100%)
Sujetos que completaron el estudio	94 (100%)	94 (100%)	188 (100%)
Sujetos que abandonaron	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Conjunto de análisis según protocolo	91 (96,8%)	86 (91,5%)	177 (94,1%)

5 Se hizo un análisis demográfico sobre el conjunto de análisis de seguridad. El conjunto de análisis de seguridad se definió como los sujetos que recibieron al menos una dosis de vacuna de estudio o control y para los que estaban disponibles datos de seguridad. Hubo un total de 98 (52,1 %) sujetos de sexo masculino y 90 (47,9 %) sujetos de sexo femenino en el conjunto de análisis de seguridad; la relación global de sujetos de sexo masculino/femenino fue 1,09. Hubo más niños que niñas en el grupo de MenACYW-TT (la relación de niños/niñas fue 1,54). Hubo más niñas que 10 niños en el grupo de MCV4-TT (la relación de niños/niñas fue 0,77). Las edades de los sujetos fueron comparables entre los 2 grupos. La edad media de los sujetos en el momento de la inclusión fue $1,44 \pm 0,302$ años en el grupo de MenACYW-TT y $1,47 \pm 0,314$ años en el grupo de MCV4-TT.

15 El porcentaje de sujetos con serorrespuesta a vacuna contra hSBA con vacuna MenACYW-TT fue comparable a la de MCV4-TT para los serogrupos A, W e Y [intervalo de un 96,7 % a un 98,9 % (MenACYW-TT) y de un 91,9 % a un 98,8 % (MCV4-TT)] (figura 15). La serorrespuesta a vacuna contra hSBA se definió como sigue: si la concentración fue $<1:8$ al inicio con concentración después de la vacunación $\geq 1:8$ o si la concentración fue $\geq 1:8$ al inicio con un aumento ≥ 4 veces después de la vacunación.

20 El porcentaje de sujetos con serorrespuesta para el serogrupo C fue mayor con MenACYW-TT (100,0 %) que con MCV4-TT (86,0 %). La tendencia para el serogrupo C fue similar usando rSBA.

25 Los datos sobre el porcentaje de sujetos que consiguen concentraciones de hSBA ≥ 8 ($\geq 1:8$) en D30 después de la vacuna se presentan en la **tabla 9**.

Tabla 9: Porcentaje de pacientes que consiguen concentraciones de hSBA de ≥ 8

Serogrupos	Porcentaje de sujetos que consiguen concentraciones en ensayo bactericida en suero humano ≥ 8 % (IC 95 %)	
	MenACYW-TT	MCV4-TT
A	97,8 (92,3; 99,7)	91,9 (83,9; 96,7)
C	100,0 (96,0; 100,0)	89,5 (81,1; 95,1)
W	98,9 (94,0; 100,0)	96,5 (90,1; 99,3)
Y	98,9 (94,0; 100,0)	100,0 (95,8; 100,0)

30 MenACYW-TT provocó respuestas inmunitarias comparables para los serogrupos A, W e Y y mayores para el serogrupo C, cuando se evaluó usando las medias geométricas de las concentraciones de hSBA y el porcentajes de sujetos que tenían concentraciones de hSBA después de la vacunación ≥ 8 ($\geq 1:8$) (figura 16 y tabla 10). La figura 16 y la tabla 10 muestran los mismos datos, excepto que los datos de la tabla 10 se convierten a escala log2 como se muestra en la figura 16.

Tabla 10: Medias geométricas de las concentraciones de hSBA después de la vacunación

	MenACYW-TT	MCV4-TT
A	76,8	61,5
C	492,9	28,4
W	71,7	44,5
Y	96,6	76,4

También se evaluó la seguridad en el estudio. El perfil de reactogenia fue comparable entre ambas vacunas. Los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 reacción declarada en el sitio de inyección fueron comparables entre ambas vacunas (48,9 % y 53,2 %). Los datos sobre eritema, dolorimiento e hinchazón en el sitio de inyección se muestran en la **figura 17**. La mayoría de las reacciones en los sitios de inyección fueron de intensidad de grado 1 o 2, todos empezaron entre D0 y D03, y la mayoría duraron de 1 a 3 días.

5 Pocos sujetos presentaron reacciones declaradas de grado 3 en el sitio de inyección: un 3,2 % de sujetos en el grupo 10 de MenACYW-TT y un 4,3 % de sujetos en el grupo MCV4-TT.

10 Las reacciones sistémicas declaradas también fueron similares entre los dos grupos (**figura 18**).

15 Los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 AA no grave no declarado fueron comparables entre los grupos de estudio. La mayoría de acontecimientos adversos no declarados fueron de intensidad de grado 1 o grado 2. No hubo AA no declarados inmediatos presentados en ninguno de los grupos. No hubo AAG inmediatos, incluyendo cualquier acontecimiento anafiláctico o potencialmente mortal. Dos acontecimientos adversos graves presentados se consideraron no relacionados.

20 La vacuna MenACYW-TT de investigación se toleró bien y fue inmunógena. Una sola dosis de la vacuna MenACYW-TT mostró excelente potencial como opción de vacuna alternativa para niños pequeños que reciben vacunación meningocócica por primera vez.

25 **e) Ensayo clínico 4 en fase II - Seguridad e inmunogenia de MenACYW-TT administrada a adolescentes sanos nulitratados con vacuna meningocócica (10-18 años)**

Este estudio en fase II evaluó la seguridad e inmunogenia de una sola dosis (10 µg de polisacárido por serogrupo, conjugado con 65 µg de TT total, en un 0,67 % de NaCl/acetato de sodio 30 mM tamponado a pH 6,0) de MenACYW-TT administrada por vía intramuscular a adolescentes con edades de 10-18 años. Se administró Menveo® (vacuna de conjugado de oligosacárido meningocócico (grupos A, C, Y y W-135) y difteria CRM197, denominada en este documento "MenACYW-CRM₁₉₇", una vacuna tetravalente aprobada de conjugado meningocócico) a un grupo de control (grupo 2). También se comparó el efecto de coadministrar MenACYW-TT con Tdap/Adacel® y HPV/Gardasil® (grupo 3) con la administración de Tdap/Adacel® y HPV/Gardasil® en solitario (grupo 4). La vacuna de control y las vacunas Tdap/Adacel® y HPV/Gardasil® se administraron de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta. Los cuatro grupos de estudio se resumen y caracterizan en la tabla 11.

Tabla 11: Grupos de estudio para ensayo clínico 4

Grupo	n	Tratamiento	Chicos	Chicas	Media, mediana de edad (años)
1	503	MenACYW-TT	243	260	11,4, 11,1
2	501	MenACYW-CRM ₁₉₇	272	229	11,4, 11,2
3	392	MenACYW-TT con Tdap/Adacel® y HPV*/Gardasil®	201	191	11,3, 11,1
4	155	Tdap/Adacel® y HPV*/Gardasil®	155	141	11,4, 11,1

*: La primera dosis de vacuna contra HPV se administró en D0; la dosis 2 y la dosis 3 de HPV se administraron 2 y 6 meses, respectivamente, después de la dosis 1.

Un total de 74 sujetos (4,3 %) no completó el ensayo: 10 (2,0 %) en el grupo 1, 7 (1,4 %) en el grupo 2, 27 (6,7 %) en el grupo 3 y 30 (10,0 %) en el grupo 4. Las razones más frecuentemente informadas para el abandono fueron: retirada voluntaria no debida a un acontecimiento adverso, quedan ilocalizables y falta de adherencia al protocolo. No hubo interrupciones tempranas debidas a un AAG u otro AA.

Se usaron ensayos bactericidas en suero con complemento humano (hSBA) para medir los anticuerpos contra los serogrupos meningocócicos A, C, W e Y al inicio y 30 días después de la dosis. El LLOQ de los ensayos bactericidas fue 1:4. Los datos de hSBA se recogieron para 463 miembros del grupo 1, 464 miembros del grupo 2 y 360 miembros del grupo 3. Los resultados de hSBA están en la tabla 12, en que el % de sujetos indica el porcentaje de sujetos con una serorrespuesta positiva, es decir, hSBA después de la vacunación $\geq 1:8$ para sujetos con concentraciones de hSBA antes de la vacunación $< 1:8$, o al menos un aumento de 4 veces en las concentraciones de hSBA desde antes hasta después de la vacunación para sujetos con concentraciones antes de la vacunación $\geq 1:8$. Un porcentaje mayor de sujetos mostró una serorrespuesta positiva con MenACYW-TT que con MenACYW-CRM₁₉₇ para los cuatro serogrupos.

Tabla 12. Resultados de hSBA para ensayo clínico 4 en fase II

	Grupo 1 (MenACYW-TT) (N = 463)	Grupo 2 (MenACYW-CRM ₁₉₇) (N = 464)	Grupo 3 (MenACYW-TT + Tdap + HPV) (N = 360)			
Serogrupo	% de sujetos	IC 95 %	% de sujetos	IC 95 %	% de sujetos	IC 95 %
A	75,6	71,4; 79,4	66,4	61,9; 70,7	80,6	76,1; 84,5
C	97,2	95,2; 98,5	72,6	68,3; 76,6	97,2	95,0; 98,7
Y	97,0	95,0; 98,3	80,8	76,9; 84,3	95,6	92,9; 97,4
W	86,2	82,7; 89,2	66,6	62,1; 70,9	83,9	79,7; 87,5

La diferencia en la frecuencia de serorrespuesta entre los grupos 1 y 2 se muestra en la tabla 13 junto con el intervalo de confianza del 95 % de la misma.

Tabla 13. Serorrespuesta diferencial del grupo 1 - grupo 2

Serogrupo	Diferencia (% de sujetos)	IC 95 %
A	9,2	3,4; 15,0
C	24,6	20,3; 29,0
Y	16,2	12,3; 20,2
W	19,6	14,2; 24,8

La diferencia en la frecuencia de serorrespuesta entre los grupos 1 y 3 no fue significativa a una confianza del 95 %, coherente con la conclusión de que la eficacia de MenACYW-TT no se ve afectada por la coadministración con Tdap/Adacev® y HPV/Gardasil®.

La tabla 14 muestra los resultados de hSBA expresados como medias geométricas de las concentraciones (GMT) a el día 0 (D0) y el día 30 (D30), junto con los intervalos de confianza del 95 %.

Tabla 14. Medias geométricas de las concentraciones de hSBA

Serogrupo		Grupo 1 (N = 463)		Grupo 2 (N = 464)		Grupo 3 (N = 360)	
		GMT	IC 95 %	GMT	IC 95 %	GMT	IC 95 %
A	D0	6,19	5,62; 6,83	5,75	5,24; 6,31	5,34	4,8; 5,94
	D30	44,1	39,2; 49,6	35,2	30,3; 41,0	47,9	41,7; 55,0
C	D0	3,36	3,12; 3,62	3,08	2,88; 3,30	3,38	3,13; 3,64
	D30	387	329; 456	51,4	41,2; 64,2	335	280; 399
Y	D0	2,33	2,23; 2,43	2,41	2,28; 2,54	2,46	2,32; 2,62
	D30	75,7	66,2; 86,5	27,6	23,8; 32,1	77,3	66,5; 89,9
W	D0	5,17	4,67; 5,73	5,35	4,82; 5,94	5,87	5,22; 6,60
	D30	86,9	77,8; 97	36,0	31,5; 41,0	91	80,2; 103

Las respuestas inmunitarias contra la difteria y el tétanos se compararon para todos los grupos. Los resultados se muestran en la tabla 15, expresados como media geométrica de la concentración (GMC); % de sujetos con $\geq 0,1$ UI/ml; y % de sujetos con $\geq 1,0$ UI/ml de las concentraciones de anticuerpos antítétanos y antidifteria.

Tabla 15. Medias geométricas y concentraciones después de la vacunación para difteria y tétanos

	Difteria			Tétanos		
	GMC	$\geq 0,1$ UI/ml (%)	$\geq 1,0$ UI/ml (%)	GMC	$\geq 0,1$ UI/ml (%)	$\geq 1,0$ UI/ml (%)
Grupo 1 (N = 463)	0,152	57,4	7,4	21,4	100	97,9
Grupo 2 (N = 464)	35,4	100	98,9	0,346	90,1	18,7
Grupo 3 (N = 360)	11,9	99,4	97,8	29,0	99,7	99,7
Grupo 4 (N = 263)	15,7	99,6	98,9	14,7	100	99,6

5 Los resultados son coherentes con la conclusión de que la coadministración de MenACYW-TT con Tdap/Adacel® como en el grupo 3 no interfería con la inmunogenia de la última (véanse los resultados del grupo 4).

10 También se caracterizaron las respuestas a la vacuna con respecto a los siguientes antígenos: toxina pertúsica (PT), hemaglutinina filamentosa pertúsica (FHA), pertactina pertúsica (PRN) y antígeno fimbrial pertúsico (FIM). Véase la tabla 16.

Tabla 16. Respuestas a antígenos PT, FHA, PRN y FIM.

Ag	Grupo 3 (N = 360)			Grupo 4 (n = 263)		
	GMT/GMC	IC 95 %	Respuesta a la vacuna (%)	GMT/GMC	IC 95 %	Respuesta a la vacuna (%)
PT	37,5	33,8; 41,7	67,3	44,4	39,5; 49,9	78,2
FHA	180	168; 194	92,1	242	218; 268	89,4
PRN	200	177; 225	94,7	265	231; 304	96,6
FIM	339	285; 403	92,2	499	414; 601	95,4

15 Se observó lo siguiente con respecto a la seguridad: incidencia, naturaleza, duración, intensidad y relación con la vacunación de cualquier acontecimiento adverso (AA) sistémico no declarado informado en los 30 minutos después de la vacunación; incidencia, tiempo hasta la aparición, número de días de existencia, intensidad, acción emprendida y si la reacción dio lugar a abandono temprano del estudio, de reacciones declaradas en el sitio de inyección que se producen hasta 7 días después de la vacunación o vacunaciones en D0; incidencia, tiempo hasta la aparición, número de días de existencia, intensidad, acción emprendida y si la reacción dio lugar a abandono temprano del estudio, de reacciones sistémicas declaradas que se producen hasta 7 días después de la vacunación o vacunaciones en D0; incidencia, naturaleza, tiempo hasta el inicio, duración, intensidad, acción emprendida, relación con la vacunación (para AA sistémicos solamente) y si el acontecimiento dio lugar a abandono temprano del estudio, de AA no declarados hasta 23-37 días después de la vacunación o vacunaciones en D0; e incidencia, naturaleza, tiempo hasta el inicio, duración, criterios de gravedad, relación con la vacunación, desenlace y si el acontecimiento adverso grave (AAG) dio lugar a abandono temprano del estudio, de AAG durante todo el ensayo hasta 180 días (grupo 1 y grupo 2) o 210 días (grupo 3 y grupo 4) después de la vacunación o vacunaciones en D0. Las reacciones sistémicas declaradas incluyeron fiebre, mialgia y cefalea. Las reacciones declaradas en el sitio de inyección incluyeron dolor, eritema e hinchazón.

30 20 Los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 reacción declarada entre D0 y D07 fueron comparables entre la vacuna de conjugado MenACYW-TT y MENVEO®: un 63,5 % (315/496) de sujetos en el grupo 1 y un 64,2 % (316/492) en el grupo 2, respectivamente. Los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 reacción declarada fueron comparables entre sujetos que recibieron vacuna de conjugado MenACYW-TT simultáneamente con Tdap y HPV frente a Tdap y HPV en solitario: un 88,9 % (345/388) en el grupo 3 y un 89,0 % (258/290) en el grupo 4, respectivamente. Los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 reacción declarada en el sitio de inyección fueron comparables entre el grupo 1, grupo 2 y grupo 3: un 46,6 % (231/496), un 45,7 % (225/492) y un 49,0 % (190/388), respectivamente. No se observó aumento en la reactogenia local para la vacuna de conjugado MenACYW-TT cuando la vacuna de conjugado MenACYW-TT se administraba simultáneamente con Tdap y HPV (grupo 3) frente a cuando la vacuna de conjugado MenACYW-TT se administraba en solitario (grupo 1).

35 40 La reacción declarada en el sitio de inyección más frecuentemente informada fue dolor, presentada por un 45,2 % (224/496) de los sujetos en el grupo 1, un 42,5 % (209/492) de los sujetos en el grupo 2 y un 47,2 % (183/388) de los sujetos en el grupo 3, seguido de eritema en el sitio de inyección que se presentó en un 5,0 % (25/496) de los sujetos

- en el grupo 1, un 7,5 % (37/491) de los sujetos en el grupo 2 y un 3,9 % (15/388) de los sujetos en el grupo 3, e hinchazón en el sitio de inyección que se presentó en un 5,4 % (27/496) de los sujetos en el grupo 1, un 6,5 % (32/491) de los sujetos en el grupo 2 y un 4,4 % (17/388) de los sujetos en el grupo 3. La mayoría de las reacciones en los sitios de inyección de la vacuna de conjugado MenACYW-TT o de MENVEO® fueron de intensidad de grado 1 o 2, empezaron entre D0 y D03, y duraron de 1 a 3 días. Los porcentajes de sujetos con cualquier reacción de grado 3 en el sitio de inyección en de la vacuna de conjugado MenACYW-TT o de MENVEO® fueron un 1,8 % (9/496) en el grupo 1, un 2,2 % (11/492) en el grupo 2 y un 2,8 % (11/388) en el grupo 3. Los porcentajes de sujetos con dolor de grado 3 en el sitio de inyección de la vacuna de conjugado MenACYW-TT o de MENVEO® fueron un 1,4 % (7/496) en el grupo 1, un 1,0 % (5/492) en el grupo 2 y un 2,3 % (9/388) en el grupo 3. Los porcentajes de sujetos con eritema de grado 3 fueron un 0,4 % (2/496) en el grupo 1, un 1,2 % (6/491) en el grupo 2 y un 0,5 % (2/388) en el grupo 3. Los porcentajes de sujetos con hinchazón de grado 3 fueron un 0,2 % (1/496) en el grupo 1, un 0,4 % (2/491) en el grupo 2 y un 0,3 % (1/388) en el grupo 3. Los grados de intensidad en general tienen los siguientes significados. Grado 1: Sin interferencia con la actividad. Grado 2: Algo de interferencia con la actividad. Grado 3: Significativo; impide la actividad diaria.
- 5 Los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 reacción sistémica declarada después de la vacunaciones fueron comparables entre el grupo 1 (52,0 % [258/496]) y el grupo 2 (51,0 % [251/492]). La mialgia fue la reacción sistémica declarada más habitualmente informada seguida de cefalea y malestar con muy pocos casos de fiebre. Se presentó mialgia en un 35,3 % (175/496) de los sujetos en el grupo 1 y un 35,2 % (173/492) de los sujetos en el grupo 2. Se presentó cefalea en un 30,2 % (150/496) de los sujetos en el grupo 1 y un 30,9 % (152/492) de los sujetos en el grupo 2. Se presentó malestar en un 26,0 % (129/496) de los sujetos en el grupo 1 y un 26,4 % (130/492) de los sujetos en el grupo 2. Se presentó fiebre en un 1,4 % (7/494) de los sujetos en el grupo 1 y un 1,2 % (6/488) de los sujetos en el grupo 2.
- 10 15 Los porcentajes de sujetos con al menos 1 reacción sistémica declarada después de la vacunaciones fueron comparables entre el grupo 3 (70,6 % [274/388]) y el grupo 4 (65,9 % [191/290]). La mialgia fue la reacción sistémica declarada más habitualmente informada: un 61,3 % (238/388) de los sujetos en el grupo 3 y un 55,4 % (160/289) de los sujetos en el grupo 4. Se presentó cefalea en un 33,8 % (131/388) de los sujetos en el grupo 3 y un 29,0 % (84/290) de los sujetos en el grupo 4. Se presentó malestar en un 29,1 % (113/388) de los sujetos en el grupo 3 y un 27,9 % (81/290) de los sujetos en el grupo 4. Se presentó fiebre en un 1,6 % (6/387) de los sujetos en el grupo 3 y un 0,7 % (2/286) de los sujetos en el grupo 4. Globalmente, la mayoría de reacciones sistémicas declaradas fueron de intensidad de grado 1 o grado 2, empezaron entre D0 y D03, y duraron de 1 a 3 días.
- 20 25 30 Los porcentajes de sujetos que presentaron reacciones sistémicas declaradas de grado 3 fueron comparables entre el grupo 1 (3,8 % [19/496]) y el grupo 2 (4,3 % [21/492]). Los porcentajes de sujetos que presentaron reacciones sistémicas declaradas de grado 3 fueron comparables entre el grupo 3 (7,5 % [29/388]) y el grupo 4 (5,5 % [16/290]). La reacción sistémica declarada de grado 3 más frecuentemente informada fue mialgia seguida de malestar y cefalea. Los porcentajes de sujetos que presentaron mialgia de grado 3 fueron comparables entre el grupo 1 (1,6 % [8/496]) y el grupo 2 (1,8 % [9/492]) y entre el grupo 3 (4,6 % [18/388]) y el grupo 4 (3,8 % [11/289]). Los porcentajes de sujetos que presentaron malestar de grado 3 fueron comparables entre el grupo 1 (2,2 % [11/496]) y el grupo 2 (2,8 % [14/492]). Se presentó malestar más frecuentemente en el grupo 3 (2,6 % [10/388]) que en el grupo 4 (1,7 % [5/290]). Los porcentajes de sujetos que presentaron cefalea de grado 3 fueron iguales tanto para el grupo 1 (1,8 % [9/496]) como para el grupo 2 (1,8 % [9/492]). Se presentó cefalea más frecuentemente en el grupo 3 (2,8 % [11/388]) que en el grupo 4 (1,7 % [5/290]).
- 35 40 45 Globalmente, los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 AA no declarado entre D0 y D30 fueron comparables entre los 4 grupos de estudio: un 22,9 % (115/503) de los sujetos en el grupo 1 y un 25,7 % (129/501) en el grupo 2; un 26,0 % (102/392) en el grupo 3 y un 22,6 % (67/296) en el grupo 4. Pocos sujetos presentaron AA no declarados inmediatos: un 0,6 % (3/503) de los sujetos en el grupo 1, un 0,2 % (1/501) de los sujetos en el grupo 2, un 0,8 % (3/392) de los sujetos en el grupo 3 y un 0,7 % (2/296) de los sujetos en el grupo 4. No hubo AAG inmediatos, incluyendo cualquier acontecimiento anafiláctico o potencialmente mortal. Doce AA no declarados inmediatos se presentaron en 9 sujetos a los 23-37 días. Un sujeto presentó 1 AA no declarado inmediato a los seis meses después de la vacunación o vacunaciones en D0.
- 50 55 60 Los porcentajes de sujetos que presentaron al menos 1 RA no declarada no grave en el sitio de inyección después de la vacunación o vacunaciones en D0 fueron comparables entre el grupo 1 y el grupo 2: un 1,4 % (7/503) y un 1,6 % (8/501), respectivamente; hubo un porcentaje numéricamente superior de sujetos que presentaron al menos 1 RA no declarado no grave en el sitio de inyección en el grupo 3 que en el grupo 4: un 4,3 % (17/392) y un 2,0 % (6/296), respectivamente. La reacción no declarada en el sitio de inyección más habitualmente presentada fue prurito, presentada en 14 sujetos, seguido de equimosis, presentada en 13 sujetos. Estas reacciones no declaradas en el sitio de inyección pueden producirse después de cualquier vacunación en general.
- 65 Los porcentajes de sujetos que presentaron al menos 1 RA no declarada no grave en el sitio de inyección de la vacuna de conjugado MenACYW-TT o de MENVEO® fueron comparables: un 1,4 % (7/503) en el grupo 1, un 1,6 % (8/501) en el grupo 2 y un 1,8 % (7/392) en el grupo 3. Un sujeto en el grupo 2 presentó 1 RA de grado 3 no declarada no grave en el sitio de inyección de calor en el sitio de inyección que empezó en D01, duró 4 días y se resolvió

espontáneamente. No se emprendieron acciones. No se presentaron RA de grado 3 no declaradas no graves en el sitio de inyección en el grupo 1 o en el sitio de inyección de la vacuna de conjugado MenACYW-TT en el grupo 3.

Los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 AA no grave no declarado en 30 días fueron comparables entre los 4 grupos de estudio: un 22,7 % (114/503) de los sujetos en el grupo 1, un 25,5 % (128/501) de los sujetos en el grupo 2, un 26,0 % (102/392) de los sujetos en el grupo 3 y un 22,3 % (66/296) de los sujetos en el grupo 4. Lo más frecuentemente presentado fueron infecciones e infestaciones (un 7,2 % [36/503] de los sujetos en el grupo 1, un 8,0 % [40/501] de los sujetos en el grupo 2, un 8,2 % [32/392] de los sujetos en el grupo 3, un 6,1 % [18/296] de los sujetos en el grupo 4); el tipo más común fue infección de las vías respiratorias altas.

Dieciséis sujetos presentaron AAG durante el periodo de ensayo; 4 sujetos presentaron AAG en 30 días desde la vacunación en D0. Ninguno se consideró relacionado con la vacuna, y ninguno dio lugar a abandono del estudio. Todos los sujetos se recuperaron. No se informaron muertes durante el periodo de estudio.

Se descubrió que la vacuna con vacuna de conjugado MenACYW-TT entre los adolescentes es segura, sin problemas de seguridad identificados cuando se administra sola o simultáneamente con las vacunas Tdap y HPV. El perfil de seguridad de la vacuna de conjugado MenACYW-TT fue comparable al de la vacuna aprobada MENVEO®.

f) Ensayo clínico 1 en fase III - Inmunogenia y seguridad de una dosis de refuerzo de MenACYW-TT en adolescentes y adultos

Este estudio evaluó la seguridad e inmunogenia de una sola dosis (10 µg de polisacárido por serogrupo, conjugado con 65 µg de TT total, en un 0,67 % de NaCl/acetato de sodio 30 mM tamponado a pH 6,0) de MenACYW-TT administrada por vía intramuscular a adolescentes (≥ 15 de <18 años) y adultos (18-59 años). A los sujetos se les había administrado una dosis de una vacuna tetravalente de conjugado meningocócico ("vacuna de sensibilización") 4-10 años antes de la administración de MenACYW-TT (grupo 1; n = 402).

Se administró Menactra® (vacuna de conjugado de sacárido capsular meningocócico (grupos A, C, Y y W-135) y toxoide diftérico, denominada en este documento "MenACYW-DT", una vacuna tetravalente aprobada de conjugado meningocócico) a un grupo de control (grupo 2; n = 407). A los sujetos del grupo 2 también se les había administrado una dosis de una vacuna de sensibilización 4-10 años antes.

En ambos grupos, la vacuna de sensibilización fue MenACYW-DT (86,3 % de todos los sujetos), MenACYW-CRM₁₉₇ (11,25 % de todos los sujetos; MenACYW-CRM₁₉₇ se analiza anteriormente con respecto al ensayo clínico 4) o desconocida (2,45 % de todos los sujetos; 9 en el grupo 1 y 10 en el grupo 2). Los datos demográficos del grupo de estudio son como en la tabla 17.

Tabla 17: Grupos de estudio para ensayo clínico 1 en fase III

Grupo	n	Tratamiento	Hombres	Mujeres	Media, mediana de edad (años)	Vacuna de sensibilización MenACYW-DT	Vacuna de sensibilización MenACYW-CRM ₁₉₇
1	402	MenACYW-TT	195	207	22,0, 16,5	327	48
2	407	MenACYW-DT	207	200	22,5, 16,4	340	39

Se realizaron ensayos de hSBA y bactericidas en suero de cría de conejo (rSBA) a los 30 días después del tratamiento. Los ensayos de hSBA también se realizaron en el día 6. El porcentaje de sujetos que mostraron una serorrespuesta positiva se da en la tabla 18. Para los resultados de hSBA, una serorrespuesta positiva fue una concentración después de la vacunación $\geq 1:16$ cuando la concentración inicial era <1:8, o un aumento de cuatro veces después de la vacunación cuando la concentración inicial era $\geq 1:8$. 384 sujetos del grupo 1 y 389 sujetos del grupo 2 obtuvieron resultados válidos de hSBA en el día 30. Para los resultados de rSBA, una serorrespuesta positiva fue una concentración después de la vacunación $\geq 1:32$ cuando la concentración inicial era <1:8, o un aumento de cuatro veces después de la vacunación cuando la concentración inicial era $\geq 1:8$.

Tabla 18. Resultados de hSBA y rSBA para ensayo clínico 5

hSBA, día 30		Grupo 1 (MenACYW-TT)		Grupo 2 (MenACYW-DT)	
Serogrupo		% de sujetos	IC 95 %	% de sujetos	IC 95 %
A		92,2	(89,0;94,7)	87,1	(83,4;90,3)
C		97,1	(94,9;98,6)	91,8	(88,6;94,3)
Y		97,4	(95,3;98,7)	95,6	(93,1;97,4)

Tabla 18. Resultados de hSBA y rSBA para ensayo clínico 5

hSBA, día 30	Grupo 1 (MenACYW-TT)		Grupo 2 (MenACYW-DT)	
Serogrupo	% de sujetos	IC 95 %	% de sujetos	IC 95 %
W	98,2	(96,3;99,3)	90,7	(87,4;93,4)
hSBA, día 6	Grupo 1 (MenACYW-TT)		Grupo 2 (MenACYW-DT)	
Serogrupo	% de sujetos	IC 95 %	% de sujetos	IC 95 %
A	72,7	(59,0;83,9)	66,1	(53,0;77,7)
C	83,6	(71,2;92,2)	87,1	(76,1;94,3)
Y	90,9	(80,0;97,0)	83,9	(72,3;92,0)
W	94,5	(84,9;98,9)	83,9	(72,3;92,0)
rSBA, día 30	Grupo 1 (MenACYW-TT)		Grupo 2 (MenACYW-DT)	
Serogrupo	% de sujetos	IC 95 %	% de sujetos	IC 95 %
A	80,2	(70,6;87,8)	71	(61,1;79,6)
C	98,9	(94,0;100,0)	96	(90,1;98,9)
Y	95,6	(89,1;98,8)	87	(78,8;92,9)
W	94,5	(87,6;98,2)	95	(88,7;98,4)

El porcentaje de sujetos que mostraron una concentración de hSBA $\geq 1:8$ en el día 30 fue $\geq 99\%$ para todos los serogrupos y no varió significativamente con la identidad de la vacuna administrada previamente (datos no mostrados).

- 5 La tabla 19 muestra las medias geométricas de las concentraciones (GMT) en el día 0 (antes del tratamiento) y en el día 30, medidas por hSBA y rSBA. Para el día 30, los resultados de hSBA se presentan para los grupos como un total y los subgrupos a los que se había administrado previamente MenACYW-DT y MenACYW-CRM₁₉₇.

Tabla 19. Medias geométricas de las concentraciones

hSBA	Grupo 1 (todos)		Grupo 2 (todos)		Grupo 1/grupo 2 GMT	
Serogrupo	GMT	IC 95 %	GMT	IC 95 %	Relación	
A	D0	13,7	(12,2;15,5)	15,1	(13,5;16,9)	
	D30	497	(436;568)	296	(256;343)	1,68 (1,38;2,05)
C	D0	11,0	(9,32;13,1)	10,6	(9,10;12,4)	
	D30	2618	(2227;3078)	599	(504;71)	4,37 (3,45;5,53)
Y	D0	7,7	(6,56;9,04)	7,27	(6,21;8,50)	
	D30	2070	(1807;2371)	811	(699;941)	2,55 (2,09;3,12)
W	D0	9,76	(8,46;11,2)	10,6	(9,21;12,2)	
	D30	1747	(1508;2025)	723	(614;853)	2,42 (1,94;3,01)
hSBA	Grupo 1 (administración previa de MenACYW-DT)		Grupo 2 (administración previa de MenACYW-DT)		Grupo 1/grupo 2 GMT	
Serogrupo	GMT	IC 95 %	GMT	IC 95 %	Relación	
A	D30	490	(424;565)	298	(255;349)	1,64 (1,33;2,03)
C	D30	2505	(2096;2993)	575	(478;691)	4,36 (3,37;5,63)
Y	D30	2009	(1737;2324)	771	(660;902)	2,61 (2,10;3,23)
W	D30	1758	(1497;2065)	671	(563;800)	2,62 (2,06;3,32)

hSBA		Grupo 1 (administración previa de MenACYW-CRM ₁₉₇)		Grupo 2 (administración previa de MenACYW-CRM ₁₉₇)		Grupo 1/grupo 2 GMT	
Serogrupo		GMT	IC 95 %	GMT	IC 95 %	Relación	
A	D30	636	(439;920)	238	(148;384)	2,67	(1,49;4,79)
C	D30	4096	(2745;6113)	771	(439;1351)	5,31	(2,74;10,3)
Y	D30	2981	(2011;4420)	1245	(738;2101)	2,39	(1,27;4,51)
W	D30	1773	(1185;2651)	1202	(697;2071)	1,48	(0,768;2,83)
rSBA		Grupo 1		Grupo 2			
Serogrupo		GMT	IC 95 %	GMT	IC 95 %		
A	D0	1097	(724;1662)	1144	(812;1613)		
	D30	10859	(8844;13333)	6608	(5410;8071)		
C	D0	15,2	(9,38;24,5)	9,1	(5,90;14,1)		
	D30	11898	(9425;15021)	2665	(1934;3672)		
Y	D0	84,2	(45,7;155)	52,7	(29,0;95,9)		
	D30	9468	(7447;12037)	3848	(2778;5331)		
W	D0	141	(74,3;269)	145	(85,0;247)		
	D30	21227	(17199;26200)	9410	(7203;12294)		

Los resultados presentados anteriormente muestran que el porcentaje de sujetos que demostraron serorrespuesta después de la administración de MenACYW-TT fue mayor que MenACYW-DT para los 4 serogrupos en el día 30 después del refuerzo usando el ensayo de hSBA. Las GMT después de la vacunación de acuerdo con hSBA también fueron numéricamente mayores para la vacuna MenACYW-TT frente a MenACYW-DT para los 4 serogrupos.

Además, la administración de una sola dosis de MenACYW-TT en adultos y adolescentes que habían recibido una sola dosis de MenACYW-DT o MenACYW-CRM₁₉₇ hacía 4-10 años, se toleró bien y no generó ningún problema de seguridad nuevo o señales de seguridad. Se observó los siguiente con respecto a la seguridad: incidencia, naturaleza, duración, intensidad y relación con la vacunación de cualquier AA sistémico no declarado informado en los 30 minutos después de la vacunación; incidencia, tiempo hasta la aparición, número de días de existencia, intensidad, acción emprendida y si la reacción dio lugar a abandono temprano del estudio, de reacciones declaradas en el sitio de inyección que se producen hasta 7 días después de la vacunación; incidencia, tiempo hasta la aparición, número días de existencia, intensidad, acción emprendida y si la reacción dio lugar a abandono temprano del estudio, de reacciones sistémicas declaradas que se producen hasta 7 días después de la vacunación; incidencia, naturaleza, tiempo hasta el inicio, duración, intensidad, acción emprendida, relación con la vacunación (para AA sistémicos solamente) y si el acontecimiento dio lugar a abandono temprano del estudio, de AA no declarados que se producen hasta D30 (+14 días); e incidencia, naturaleza, tiempo hasta el inicio, duración, criterios de gravedad, relación con la vacunación, desenlace y si el AAG dio lugar a abandono temprano del estudio, de AAG durante todo el ensayo. Los AA declarados fueron esencialmente como se describe anteriormente para el ensayo 4 en fase II.

Globalmente, los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 reacción declarada fueron comparables entre el grupo 1 y el grupo 2: un 64,3 % (256/398) de los sujetos en el grupo 1 y un 65,4 % (263/402) de los sujetos en el grupo 2, respectivamente. Los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 reacción declarada de grado 3 fueron comparables entre el grupo 1 y el grupo 2: un 5,0 % (20/398) de los sujetos en el grupo 1 y un 5,5 % (22/402) de los sujetos en el grupo 2, respectivamente. Los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 reacción declarada en el sitio de inyección fueron comparable entre el grupo 1 y grupo 2: un 46,5 % (185/398) de los sujetos en el grupo 1 y un 49,3 % (198/402) de los sujetos en el grupo 2, respectivamente. La reacción declarada en el sitio de inyección más frecuentemente presentada fue dolor presentado en un 44,7 % (178/398) de los sujetos en el grupo 1 y un 48,8 % (196/402) de los sujetos en el grupo 2. Se presentaron menos frecuentemente eritema e hinchazón. El eritema y la hinchazón se presentaron a una frecuencia mayor en el grupo 1 (5,0 % [20/398] y 4,0 % [16/398], respectivamente) que en el grupo 2 (1,5 % [6/402] y 0,7 % [3/402], respectivamente). La mayoría fueron de intensidad de grado 1; los porcentajes de sujetos que presentaron eritema e hinchazón de grado 2 fueron comparables entre el grupo 1 (0,5 % [2/398] y 0,8 % [3/398], respectivamente) y el grupo 2 (0,2 % [1/402] y 0,5 % [2/402], respectivamente). No se presentó eritema o hinchazón de grado 3 en ningún grupo. La mayoría de las reacciones en los sitios de inyección de la vacuna de conjugado MenACYW o de Menactra® fueron de intensidad de grado 1 o 2, la mayoría empezaron entre D0 y D03, y la mayoría duraron de 1 a 3 días. Pocos sujetos presentaron reacciones declaradas de grado 3 en el sitio de

inyección: un 1,0 % (4/398) de los sujetos en el grupo 1 y un 2,0 % (8/402) de los sujetos en el grupo 2 presentaron dolor de grado 3. Ningún sujeto en ningún grupo presentó eritema o hinchazón de grado 3.

- 5 Los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 reacción sistémica declarada fueron comparables entre el grupo 1 y el grupo 2: un 55,3 % (220/398) de los sujetos en el grupo 1 y un 54,2 % (218/402) de los sujetos en el grupo 2, respectivamente. La mialgia y la cefalea fueron las reacciones sistémicas declaradas más frecuentemente presentadas: se presentó mialgia en un 36,7 % (146/398) de los sujetos en el grupo 1 y en un 38,8 % (156/402) de los sujetos en el grupo 2; se presentó cefalea en un 37,9 % (151/398) de los sujetos en el grupo 1 y un 33,3 % (134/402) de los sujetos en el grupo 2. Se presentó malestar en un 27,6 % (110/398) de los sujetos en el grupo 1 y en un 26,9 % (108/402) de los sujetos en el grupo 2. No se presentó fiebre en el grupo 1 (0,0 % [0/390]) y se presentó en un 0,5 % (2/395) de los sujetos en el grupo 2. Globalmente, la mayoría de reacciones sistémicas declaradas fueron de intensidad de grado 1 o grado 2, empezaron entre D0 y D30, y duraron de 1 a 3 días. Pocos sujetos presentaron reacciones sistémicas declaradas de grado 3. Los porcentajes de sujetos que presentan una reacción sistémica declarada de grado 3 fueron similares entre el grupo 1 y el grupo 2 para fiebre (0,0 % [0/390] y 0,3 % [1/395], respectivamente), cefalea (2,3 % [9/398] y 3,5 % [14/402], respectivamente), malestar (2,8 % [11/398] y 3,5 % [14/402], respectivamente) y mialgia (2,0 % [8/398] y 2,2 % [9/402], respectivamente).
- 10 Los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 AA no grave no declarado entre D0 y D30 fueron comparables entre el grupo 1 (26,1 % [105/402]) y el grupo 2 (25,3 % [103/407]). El número de AA no graves no declarados fue igual en el grupo 1 (n = 164 AA) y en el grupo 2 (n = 164 AA). Un porcentaje pequeño y comparable de AA no graves no declarados se consideraron relacionados con la vacuna administrada en D0: un 3,0 % (12/402) de los sujetos en el grupo 1 y un 2,9 % (12/407) de los sujetos en el grupo 2. La mayoría de estos acontecimientos fueron de intensidad de grado 1 o grado 2.
- 15 25 Dos sujetos (0,5 %) en el grupo 1 y ningún sujeto (0,0 %) en el grupo 2 presentaron al menos 1 AA no declarado inmediato (mareo en ambos sujetos).
- 20 30 Un total de 5 sujetos (1,2 %) en el grupo 1 y 6 sujetos (1,5 %) en el grupo 2 presentaron al menos 1 RA no grave no declarada en el sitio de inyección. Se presentó equimosis en el sitio de inyección en 2 sujetos (0,5 %) en el grupo 1 y en 3 sujetos (0,7 %) en el grupo 2. Se presentó prurito en el sitio de inyección en 2 sujetos (0,5 %) en el grupo 1 y en 1 sujeto (0,2 %) en el grupo 2. Se presentó calor en el sitio de inyección en 1 sujeto (0,2 %) en el grupo 1. Se presentó decoloración en el sitio de inyección y urticaria en el sitio de inyección en 1 sujeto cada una (0,2 %) en el grupo 2. La decoloración en el sitio de inyección fue de grado 3 y fue persistente hasta el final del estudio.
- 35 40 45 50 55 60 65
- 35 Las infecciones e infestaciones fueron los AA sistémicos no graves no declarados más frecuentemente presentados (un 7,5 % [30/402] de los sujetos en el grupo 1 y un 6,6 % [27/407] de los sujetos en el grupo 2). Los tipos más frecuentemente presentados de infecciones o infestaciones fueron nasofaringitis, presentada en un 1,7 % (7/402) de sujetos en el grupo 1 y un 1,7 % (7/407) de sujetos en el grupo 2; e infección de las vías respiratorias altas, presentada en un 1,0 % (4/402) de sujetos en el grupo 1 y un 1,7 % (7/407) de sujetos en el grupo 2. También se presentaron frecuentemente en el SOC de trastornos respiratorios, torácicos y mediastinales: un 6,0 % (24/402) de sujetos en el grupo 1 y un 6,6 % (27/407) de sujetos en el grupo 2, incluyendo tos y dolor orofaríngeo. La mayoría de AA no graves no declarados en 30 días desde la inyección de la vacuna fueron de intensidad de grado 1 o grado 2. Los porcentajes de sujetos que presentan al menos 1 AA sistémico no grave no declarado de grado 3 fueron comparables entre ambos grupos: un 3,7 % (15/402) de los sujetos en el grupo 1 y un 4,2 % (17/407) de los sujetos en el grupo 2.
- 45 Las RA sistémicas no graves no declaradas se presentaron más frecuentemente en la clasificación de trastornos generales y condiciones del sitio de administración, presentadas en un 2,2 % (9/402) de sujetos en el grupo 1 y un 1,7 % (7/407) de sujetos en el grupo 2. La RA sistémica no grave no declarada más frecuentemente presentada en esta clasificación fue fatiga, presentada en un 0,5 % (2/402) de sujetos en el grupo 1 y un 0,2 % (1/407) de sujetos en el grupo 2. Solamente 1 sujeto en el grupo 2 presentó 2 RA sistémicas no graves no declaradas de grado 3: Náuseas de grado 3 en el SOC de trastornos gastrointestinales y fatiga de grado 3 en la clasificación de trastornos generales y condiciones del sitio de administración. Ambos empezaron en D0 y duraron 2 días. Se dio medicación para las náuseas; no se emprendieron acciones para la fatiga.
- 55 No hubo AA o RA que dieran lugar a abandono del estudio en ningún grupo. Tres sujetos experimentaron AAG en los primeros 30 días después de la vacunación: embolia pulmonar bilateral en 1 sujeto en el grupo 1 y trastorno depresivo mayor y dolor torácico en 1 sujeto cada uno en el grupo 2. Ninguno de estos AAG se consideró relacionado con la vacuna por parte del investigador y ninguno dio lugar a abandono del estudio.
- 60 Seis sujetos (4 en el grupo 1 y 2 en el grupo 2) experimentaron un total de 6 AAG después de D30 hasta el seguimiento de 6 meses: 4 sujetos (1,0 %) en el grupo 1 experimentaron 4 AAG y 2 sujetos (0,5 %) en el grupo 2 experimentaron 2 AAG. Ninguno de los AAG se consideró relacionado con la vacuna y ninguno dio lugar a abandono del estudio. No se informaron muertes durante el estudio.
- 65 Se descubrió que la vacunación con una dosis de refuerzo de vacuna de conjugado MenACYW en adolescentes y adultos sensibilizados con vacuna tetravalente de conjugado meningocócico con edades de al menos 15 años era

segura, sin cuestiones de seguridad identificadas. Globalmente, el perfil de seguridad de la vacuna de conjugado MenACYW fue comparable con el de la vacuna aprobada, Menactra®.

7. Estabilidad de formulación líquida de MenACYW-TT

Algunos o todos los componentes de las vacunas existentes de conjugado de polisacárido meningocócico tales como MenACWY-CRM₁₉₇/Menveo® (un conjugado tetravalente con CRM197, en que el conjugado MenA está liofilizado) y MCV4-TT/Nimenrix® (un conjugado tetravalente con TT completamente liofilizado) no se almacenan a largo plazo como formulaciones líquidas. Menactra® (un conjugado tetravalente con TT) se almacena como una formulación líquida, pero su vida útil es de 24 meses. En una publicación reciente, Beresford *et al.* caracterizaron la estabilidad de diversas vacunas existentes y observaron despolimerización y pérdida de inmunogenicidad en determinadas condiciones, que dieron lugar a recomendar que para "cualquier vacuna de conjugado de sacárido MenACWY-proteína recién desarrollada, una recomendación clave sería considerar la liofilización del producto final para evitar la degradación perjudicial que afectaría a la inmunogenicidad." Beresford *et al.*, Vaccine 2017 Jun 16; 35(28):3598-3606 en el Abstract.

Las formulaciones líquidas son ventajosas al menos debido a que no requieren una etapa de liofilización durante la fabricación, no requieren una etapa de reconstitución antes de la administración y evitan el riesgo de posibles errores asociados con la reconstitución. Por supuesto, estas ventajas son irrelevantes si el propio producto experimenta degradación que comprometa la inmunogenicidad. Por consiguiente, sería deseable una vacuna de conjugado MenACYW que sea estable como formulación líquida durante más de 24 meses. La estabilidad de MenACYW-TT de acuerdo con la presente divulgación se caracterizó como sigue.

MenACYW-TT se almacenó en un 0,67 % de NaCl/acetato de sodio 30 mM tamponado a pH 6,0 durante 54 meses a 2 °C-8 °C y se ensayó su estabilidad en puntos temporales seleccionados de 0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 y 54 meses (véase la tabla 20). Los parámetros medidos incluyeron aspecto visual, esterilidad, ausencia de toxicidad anómala, polisacárido total de cada serogrupo, % de polisacárido libre, peso molecular, polidispersidad, pH e inmunogenicidad.

También se realizó ensayo acelerado de estabilidad de MenACYW-TT almacenando la formulación a 23 °C-27 °C. Los ensayos se realizaron en uno o más de 1 semana, 3 meses y 6 meses (véase la tabla 21).

Con respecto al aspecto visual, la solución permaneció transparente durante los períodos completos de 54 meses a 2 °C-8 °C y 6 meses a 23 °C-27 °C y no se apreciaron defectos (se ensayaron todos los puntos temporales enumerados anteriormente).

Se determinó ausencia de toxicidad anómala observando a roedores (ratones o cobayas) después de la administración de una dosis de MenACYW-TT. En todos los ensayos, todos los animales sobrevivieron el periodo de ensayo de 28 días después de la administración; no hubo respuestas inespecíficas o inesperadas; y los animales no perdieron peso durante el periodo de ensayo. Se realizó ensayo de toxicidad anómala en los puntos temporales de 0, 12, 24, 36, 42, 48 y 54 meses.

El pH fue 6,1 en 0 meses y todas las mediciones se hicieron en el intervalo de 6,1 a 6,3 en todos los ciclos de tiempo (los puntos temporales para el pH fueron 0, 1, 6, 12, 24, 36, 42, 48 y 54 meses a 2 °C-8 °C y 6 meses a 23 °C-27 °C). No se observó crecimiento en ninguno de los puntos temporales ensayados, incluyendo 54 meses (los puntos temporales para la esterilidad fueron 0, 12, 24, 36, 42, 48 y 54 meses a 2 °C-8 °C y 6 meses a 23 °C-27 °C).

El polisacárido total se midió por cromatografía Dionex™. El % de polisacárido libre se midió por cromatografía Dionex™ y precipitación con desoxicolato. El peso molecular y la polidispersidad se midieron por cromatografía de exclusión por tamaño/dispersión de luz de múltiple ángulo (SEC/MALS).

Los resultados para 2 °C-8 °C están en la tabla 20 y los resultados para 23 °C-27 °C están en la tabla 21.

Tabla 20: Resultados de ensayo de estabilidad para almacenamiento a 2 °C hasta 8 °C.

Ensayo	Serogrupo	Tiempo 0	1 Mes	3 Meses	6 Meses	9 Meses	12 Meses	18 Meses
Polisacárido total (µg/ml)	A	20,2	19,3	16,6	18,2	18,8	21,3	21,9
	C	19,4	20,8	15,0	14,5	16,2	18,3	20,4
	Y	16,7	16,2	20,7	16,8	16,9	17,2	16,4
	W-135	15,9	15,6	12,4	15,9	15,5	16,3	17,5
% de polisacárido libre	A	<15 %	<16 %	<18 %	<17 %	<16 %	<14 %	<14 %
	C	<16 %	<14 %	<20 %	<21 %	<19 %	<16 %	<15 %

Ensayo	Serogrupo	Tiempo 0	1 Mes	3 Meses	6 Meses	9 Meses	12 Meses	18 Meses
W-135	Y	<18 %	19 %	<15 %	<18 %	<18 %	18 %	<18 %
	W-135	<19 %	<19 %	<24 %	<19 %	<19 %	<18 %	<17 %
Peso molecular	Todos	9,122E5	5,095E5	7,679E5	7,713E5	1,533E6	8,348E5	9,958E5
Polidispersidad	Todos	1,381	1,359	1,298	1,311	1,862	1,256	1,581
Ensayo	Serogrupo	Tiempo 0	24 Meses	30 Meses	36 Meses	42 Meses	48 Meses	54 Meses
Polisacárido total (µg/ml)	A	20,2	19,4	19,4	18,4	19,2	18,6	18,8
	C	19,4	17,7	18,2	18,2	22,4	21,6	20,0
	Y	16,7	13,5	14,6	14,7	18,5	14,8	14,2
	W-135	15,9	14,6	13,3	13,5	15,3	15,5	14,5
% de polisacárido libre	A	<15 %	<15 %	<15 %	<16 %	<16 %	17	17
	C	<16 %	<17 %	<16 %	<16 %	<13 %	<14	<15
	Y	<18 %	<22 %	<20 %	<20 %	21 %	<20	<21
	W-135	<19 %	<21 %	<23 %	<22 %	<20 %	<19	<21
Peso molecular	Todos	9,122E5	9,958E5	1,192E6	5,419E5	8,286E5	7,700E5	8,092E5
Polidispersidad	Todos	1,381	1,581	1,432	1,288	1,485	1,572	1,495

NS: no programado. †: Las muestras de suero se mantuvieron a <-20 °C durante aproximadamente 6-7 meses, donde se consideraron estables, antes del ensayo.

Tabla 21: Resultados de ensayo de estabilidad para almacenamiento a 23 °C hasta 27 °C.

Ensayo	Serogrupo	1 Semana	3 Meses	6 Meses
Polisacárido total (µg/ml)	A	19,4	22,0	22,0
	C	14,1	20,5	19,9
	Y	13,9	17,0	15,9
	W-135	15,5	17,3	16,2
% de polisacárido libre	A	<15 %	27 %	31 %
	C	<21 %	25 %	18 %
	Y	<22 %	<18 %	30 %
	W-135	<19 %	17 %	28 %
Peso molecular	Todos	8,212E5	8,285E5	6,209E5
Polidispersidad	Todos	1,335	1,361	1,474

NS: no programado.

- 5 Los resultados indicaron buena estabilidad durante los períodos completos de 54 meses a 2 °C-8 °C y 6 meses a 23 °C-27 °C. En particular, a 2 °C-8 °C, para los cuatro serogrupos, hubo pérdida mínima de conjugación del polisacárido con TT (un 0-3 % de aumento en el % de polisacárido libre) y la inmunogenia se mantuvo sustancialmente en todos los puntos temporales excepto durante 24 meses, en que los valores bajos parecen ser valores atípicos y/o se han producido por una cuestión técnica, en función de las observaciones a los 36 meses y posteriormente, que son más similares a las mediciones de 0 y 12 meses. A 23 °C-27 °C, hubo un aumento en el polisacárido libre para MenA, MenY y MenW en seis meses, pero los niveles permanecieron por debajo del límite aceptable de un 40 %. Aún había inmunogenia presente a los seis meses.
- 10 A partir de estos resultados, se puede concluir que MenACYW-TT puede mantenerse a largo plazo como una formulación líquida en refrigeración, por ejemplo, durante el envasado, distribución y almacenamiento, y que la liofilización u otras medidas para su conservación son innecesarias.
- 15

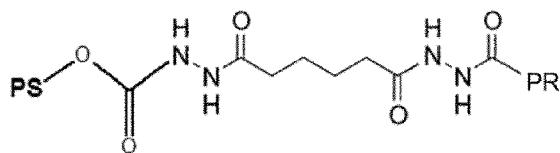
Aunque la invención anterior se ha descrito con algo de detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión, los ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* que comprende:
 - a) un primer conjugado de polisacárido capsular MenA con una proteína transportadora;
 - b) un segundo conjugado de polisacárido capsular MenC con una proteína transportadora;
 - c) un tercer conjugado de polisacárido capsular MenW-135 con una proteína transportadora; y
 - d) un cuarto conjugado de polisacárido capsular MenY con una proteína transportadora; en donde:
 - (i) el segundo conjugado es una población que comprende polisacáridos conjugados ligados en ambos extremos y polisacáridos conjugados ligados en un extremo, y los polisacáridos del segundo conjugado tienen un nivel de O-acetilación de 0,3 μ mol/mg de polisacárido a 1,6 μ mol/mg de polisacárido, y en donde los polisacáridos conjugados ligados en un extremo tienen un sacárido ni ligado terminal;
 - (ii) el polisacárido capsular MenA se une a la proteína transportadora a través de un conector que comprende un carbamato, un espaciador y una amida, en donde el espaciador está entre el carbamato y la amida y comprende 2-10 carbonos lineales, y el primer conjugado tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,3 a 1,5;
 - (iii) los polisacáridos capsulares MenC, MenW-135 y MenY se unen a la proteína transportadora a través de una amina secundaria y al menos uno de los conjugados tiene un peso molecular promedio en peso que varía de 300 kDa a 1500 kDa;
 - (iv) la proteína transportadora es toxoide tetánico, y
- 20 la composición comprende menos de un 20 % de polisacárido libre en peso con respecto al polisacárido total.
2. La composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* de la reivindicación 1, en donde el primer, segundo, tercer y/o cuarto conjugados son una población que comprende moléculas con un peso molecular en el intervalo de 700 kDa a 1400 kDa o de 800 kDa a 1300 kDa.
- 25 3. Una composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* que comprende un conjugado de polisacárido capsular MenC con una proteína transportadora, en donde el conjugado es una población que comprende polisacáridos conjugados ligados en ambos extremos y polisacáridos conjugados ligados en un extremo, que ambos se unen a la proteína transportadora a través de una amina secundaria, y los polisacáridos del conjugado de polisacárido capsular MenC con la proteína transportadora tienen un nivel de O-acetilación que tiene de 0,3 μ mol/mg de polisacárido a 1,6 μ mol/mg de polisacárido, en donde la proteína transportadora es toxoide tetánico.
- 30 4. La composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* de la reivindicación 3, en donde el conjugado de polisacárido capsular MenC con la proteína transportadora:
 - (a) tiene un peso molecular promedio en peso que varía de 300 kDa a 1500 kDa; o
 - (b) es una población que comprende moléculas que tienen un peso molecular en el intervalo de 700 kDa a 1400 kDa o de 800 kDa a 1300 kDa.
- 35 5. La composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* está libre de adyuvante y/o comprende tampón acetato con un pH de 5,5 a 6,5.
- 40 6. La composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polisacárido capsular MenC tiene un grado de O-acetilación que varía de 0,6 a 1,5 μ mol/mg de polisacárido o de 0,8 a 1,4 μ mol/mg de polisacárido.
- 45 7. La composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el conjugado que comprende polisacárido MenC comprende una o más modificaciones elegidas de (i) un hidroxilo primario en la posición 7, (ii) un (2-hidroxi)etoxi en el extremo reductor, y (iii) una conjugación con la proteína transportadora, en donde las modificaciones están presentes a no menos de 25 nmol/mg de polisacárido.
- 50 8. La composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el polisacárido capsular MenC está reducido en tamaño en 3x-8x con respecto al polisacárido MenC natural.
- 55 9. La composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* de las reivindicaciones 1, 2, y 5 a 8, en donde:
 - (i) el primer conjugado tiene una relación en masa de polisacárido capsular MenA a proteína transportadora de 0,5 a 1,5 o de 0,7 a 1,4;
 - (ii) el segundo conjugado tiene una relación en masa de polisacárido capsular MenC a proteína transportadora de 0,3 a 1,1;
 - (iii) el cuarto conjugado tiene una relación en masa de polisacárido capsular MenY a proteína transportadora de 0,3 a 1,1; y/o
 - (iv) el tercer conjugado tiene una relación en masa de polisacárido capsular MenW-135 a proteína transportadora de 0,3 a 1,3.
- 60 10. La composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* de la reivindicación 3 o 4, que comprende además un conjugado de polisacárido capsular MenA con una proteína transportadora que tiene una relación en masa de

polisacárido a proteína transportadora de 0,5 a 1,5; un conjugado de polisacárido capsular MenW-135 con una proteína transportadora que tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,3 a 1,3; y un conjugado de polisacárido capsular MenY con una proteína transportadora que tiene una relación en masa de polisacárido a proteína transportadora de 0,5 a 1,3.

- 5 11. La composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* de la reivindicación 10, en donde:
 (i) el polisacárido capsular MenA se une a la proteína transportadora a través de un conector que comprende un carbamato, un espaciador y una amida, en donde el espaciador está entre el carbamato y la amida y comprende 2-10 carbonos lineales, y el conjugado tiene una relación en masa de polisacárido capsular MenA a proteína transportadora de 0,3 a 1,5;
 10 (ii) los polisacáridos capsulares MenW-135 y MenY se unen a la proteína transportadora a través de una amina secundaria, y los conjugados tienen un peso molecular promedio en peso que varía de 300 kDa a 1500 kDa; y
 (iii) la composición comprende menos de un 20 % de polisacárido libre en peso con respecto al polisacárido total.
- 15 12. La composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, y 5 a 11, en donde el polisacárido capsular MenA se une a la proteína transportadora a través de un conector de fórmula (I):

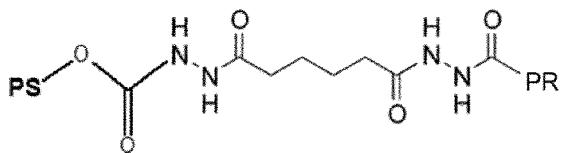


(I)

- 20 en donde PS indica la unión al polisacárido y PR indica la unión a la proteína transportadora.

13. La composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* de la reivindicación 1, en donde:

- a) el polisacárido capsular MenA se une a la proteína transportadora toxoide tetánico a través de un conector de fórmula (I):



(I)

en donde PS indica la unión al polisacárido y PR indica la unión a la proteína transportadora, y en donde la relación en masa del polisacárido capsular MenA a la proteína transportadora toxoide tetánico es de 0,5 a 1,5; y/o

- 30 b) el polisacárido capsular MenC se une a la proteína transportadora toxoide tetánico a través de una amina secundaria, en donde el segundo conjugado es una población que comprende polisacáridos conjugados ligados en ambos extremos y polisacáridos conjugados ligados en un extremo, en donde los polisacáridos tienen un nivel de O-acetilación de 0,3 µmol/mg de polisacárido a 1,6 µmol/mg de polisacárido, en donde el segundo conjugado tiene un peso molecular promedio en peso que varía de 300 kDa a 1500 kDa, en donde el polisacárido capsular MenC está reducido en tamaño en 3x-8x con respecto al polisacárido MenC natural, y en donde la relación en masa de polisacárido capsular MenC a proteína transportadora toxoide tetánico es de 0,3 a 1,1; y/o
 35 c) el polisacárido capsular MenW-135 se une a la proteína transportadora toxoide tetánico a través de una amina secundaria, y en donde la relación en masa de polisacárido capsular MenW-135 a proteína transportadora toxoide tetánico es de 0,3 a 1,3; y/o
 40 d) el polisacárido capsular MenY se une a la proteína transportadora toxoide tetánico a través de una amina secundaria, y en donde la relación en masa de polisacárido capsular MenY a proteína transportadora toxoide tetánico es de 0,5 a 1,3; y

la composición comprende menos de un 20 % de polisacárido libre en peso con respecto al polisacárido total.

- 45 14. La composición de vacuna contra *Neisseria meningitidis* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en un método de vacunación de un sujeto contra *Neisseria meningitidis*, en donde la vacuna se administra preferiblemente por vía intramuscular, y/o en donde el sujeto es preferiblemente de 6 semanas a 3 años de edad o de 50 años o más de edad.

Conjugado de serogrupo A

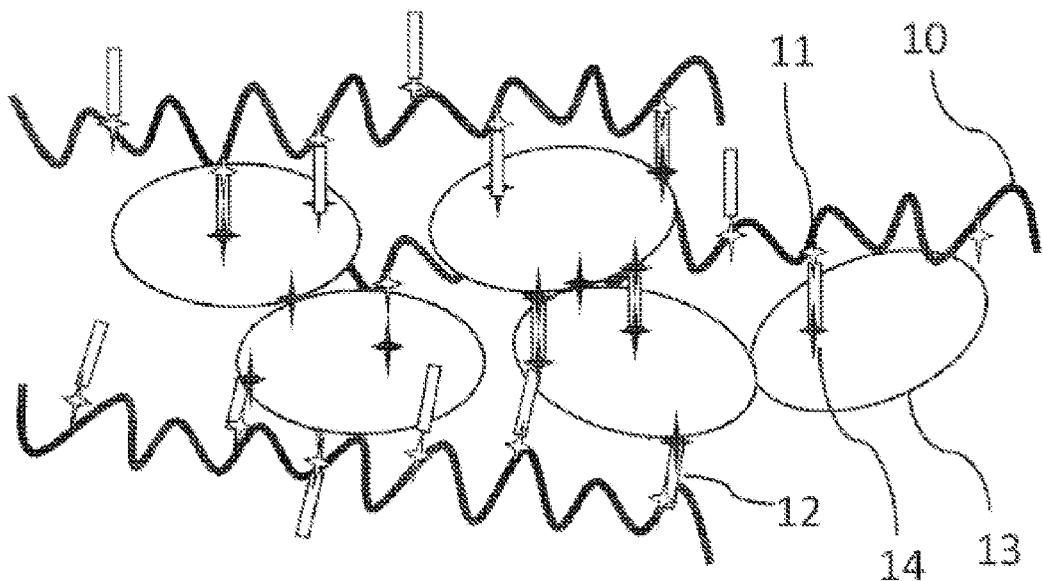


Fig. 1A

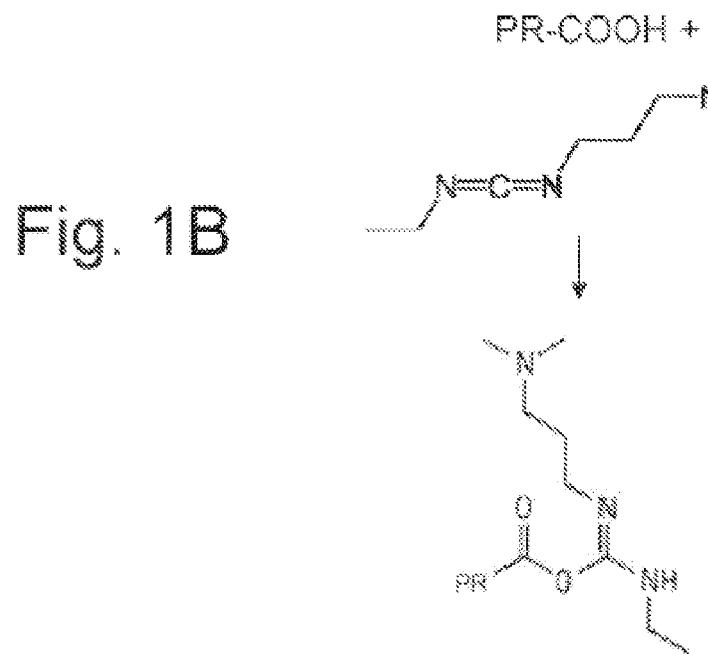


Fig. 1B

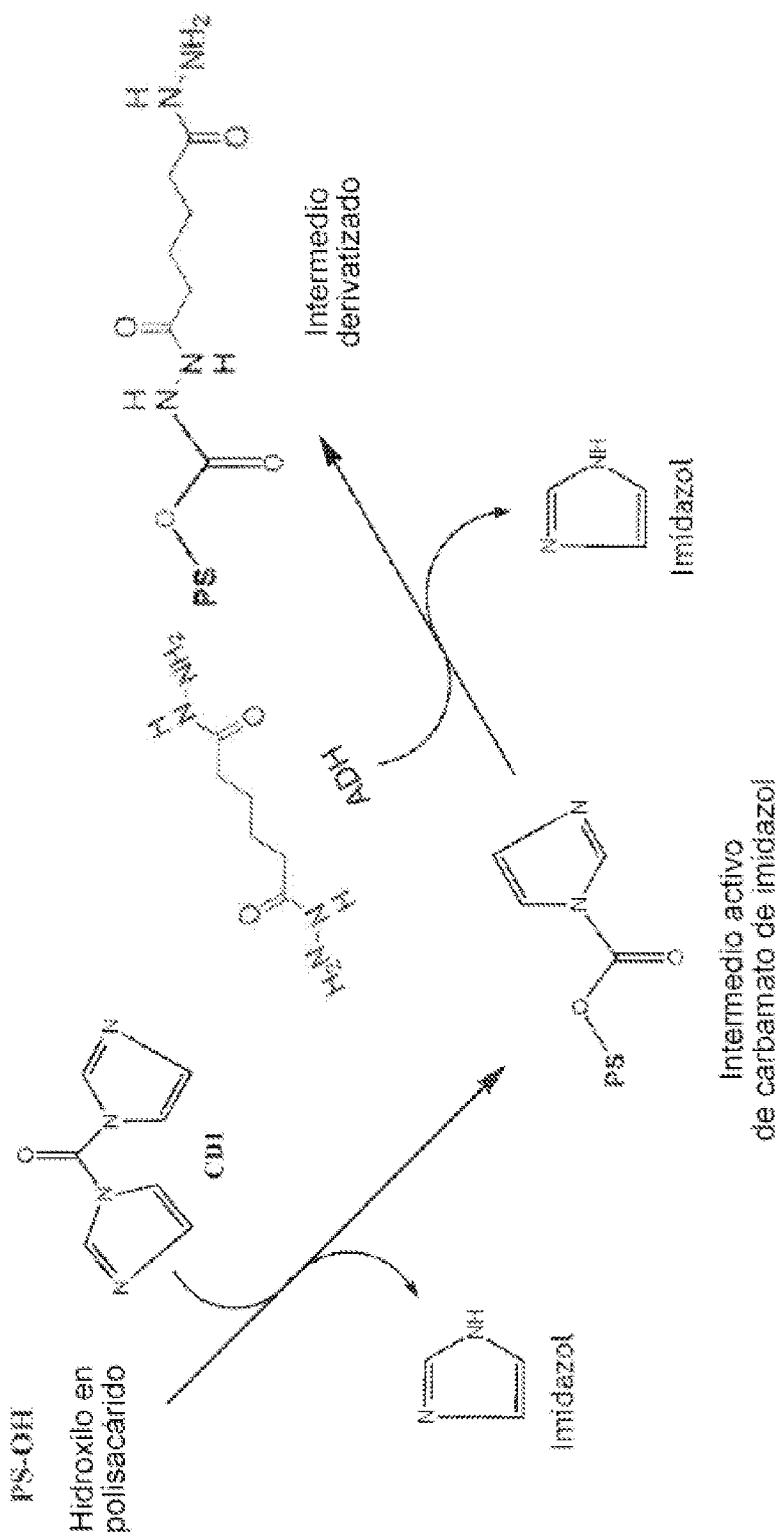


Fig. 1C

Intermedio activo
de carbamato de imidazol

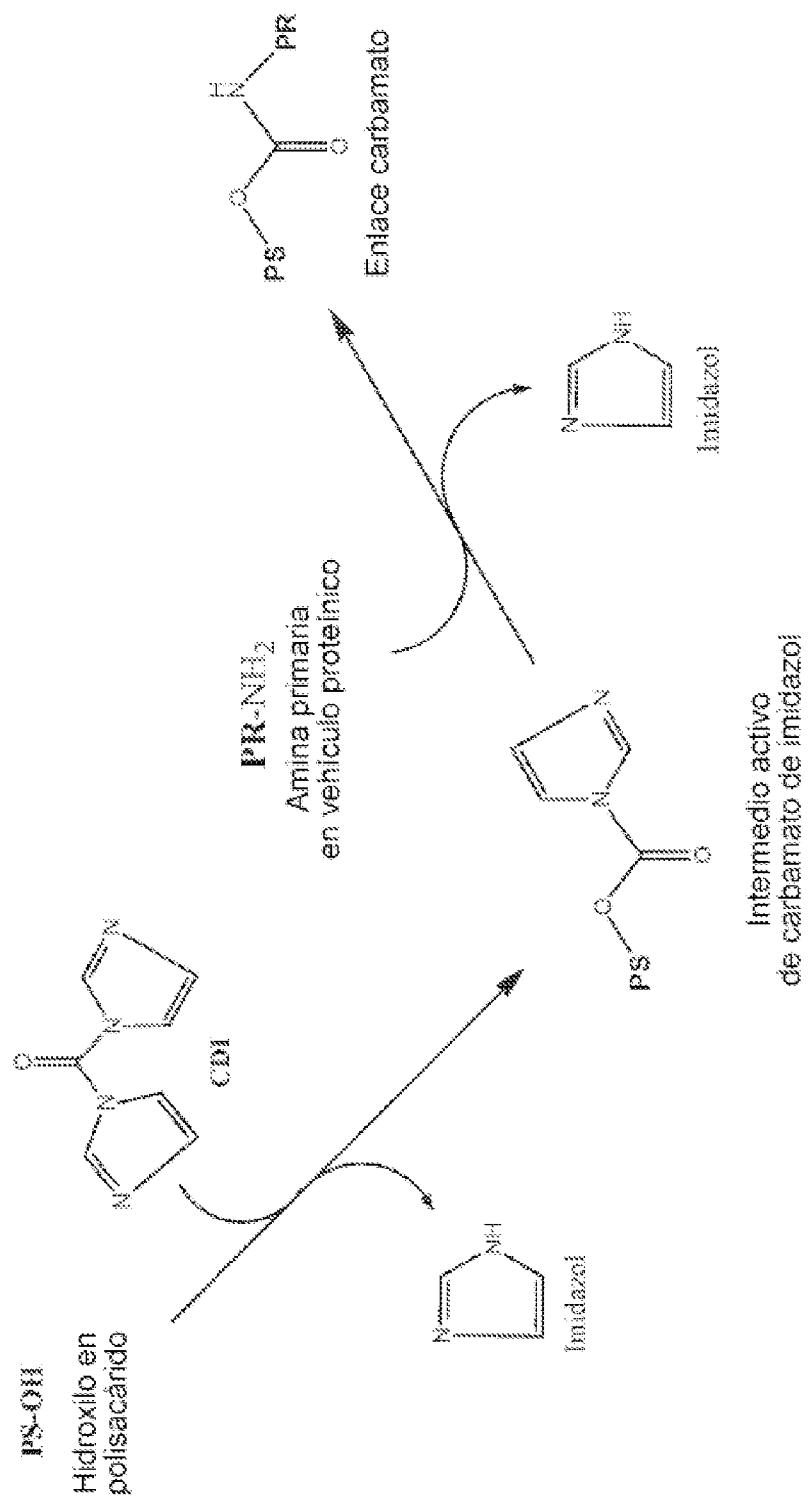


Fig. 1D

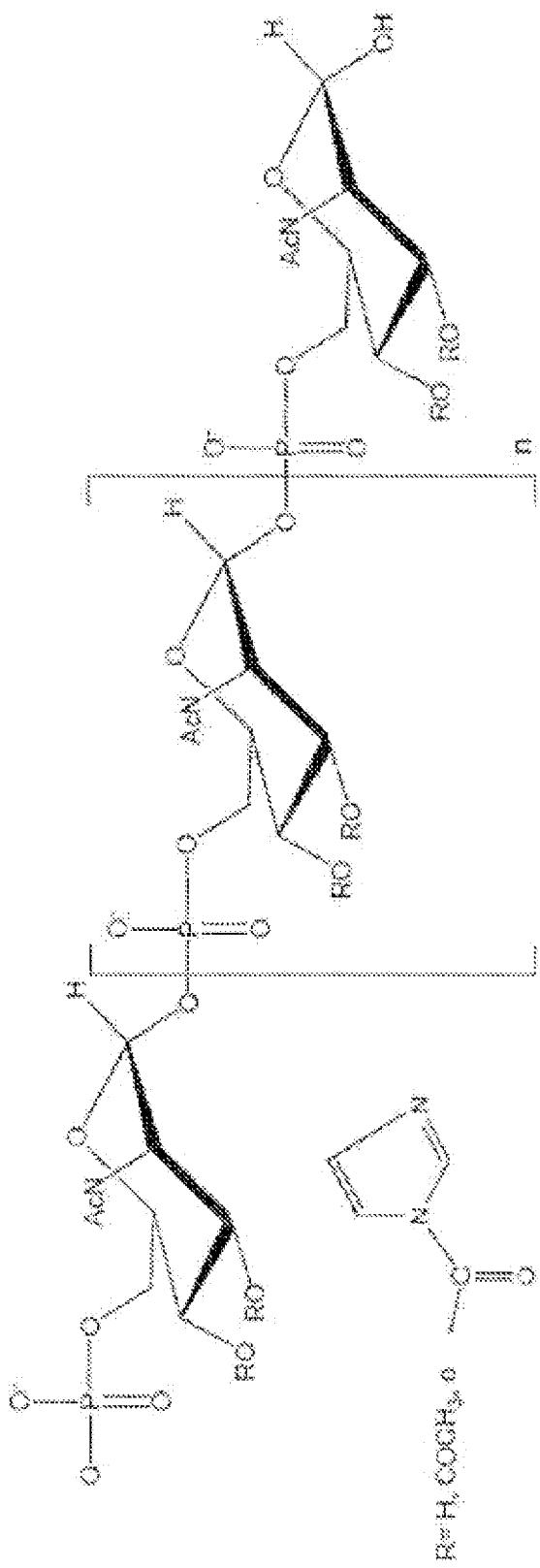


Fig. 1E

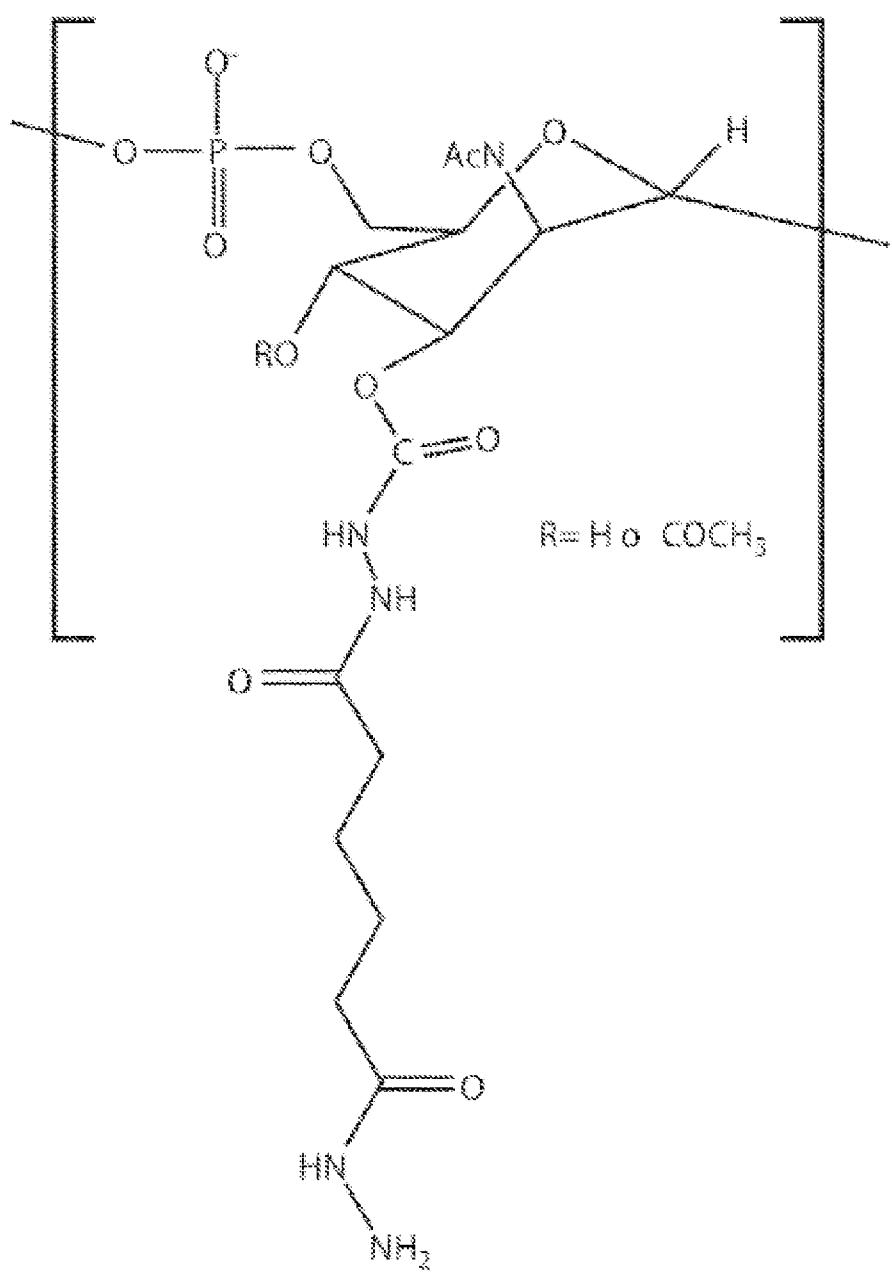


Fig. 1F

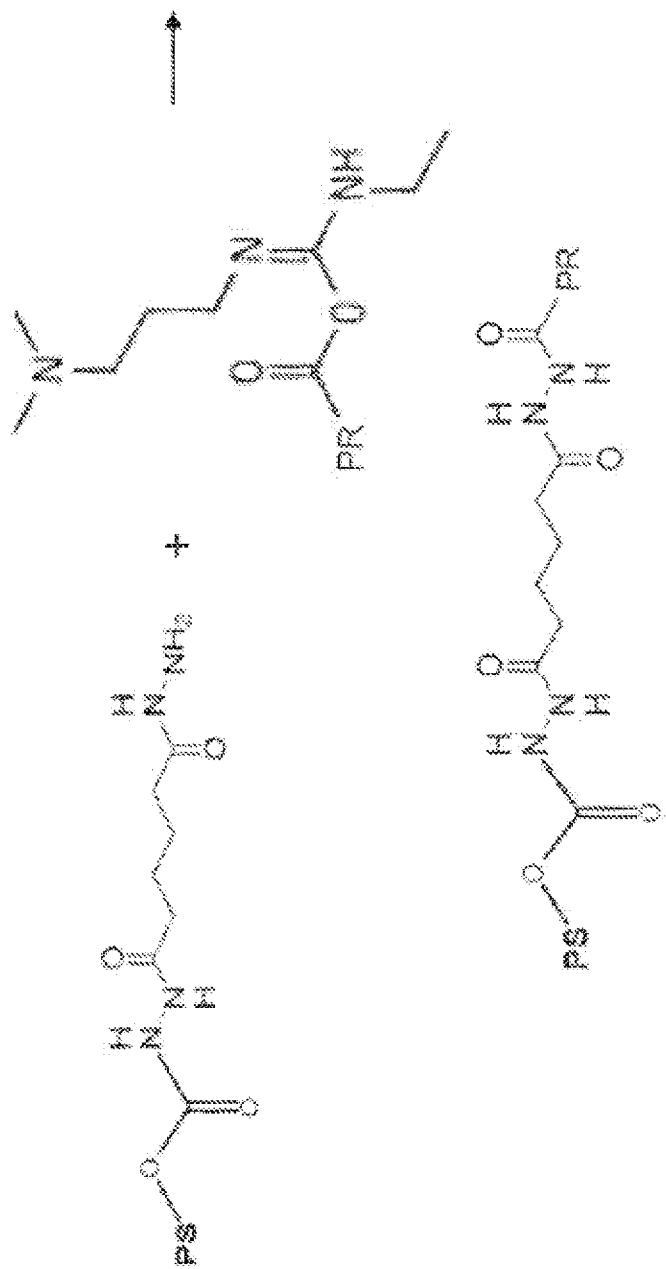


Fig. 1G

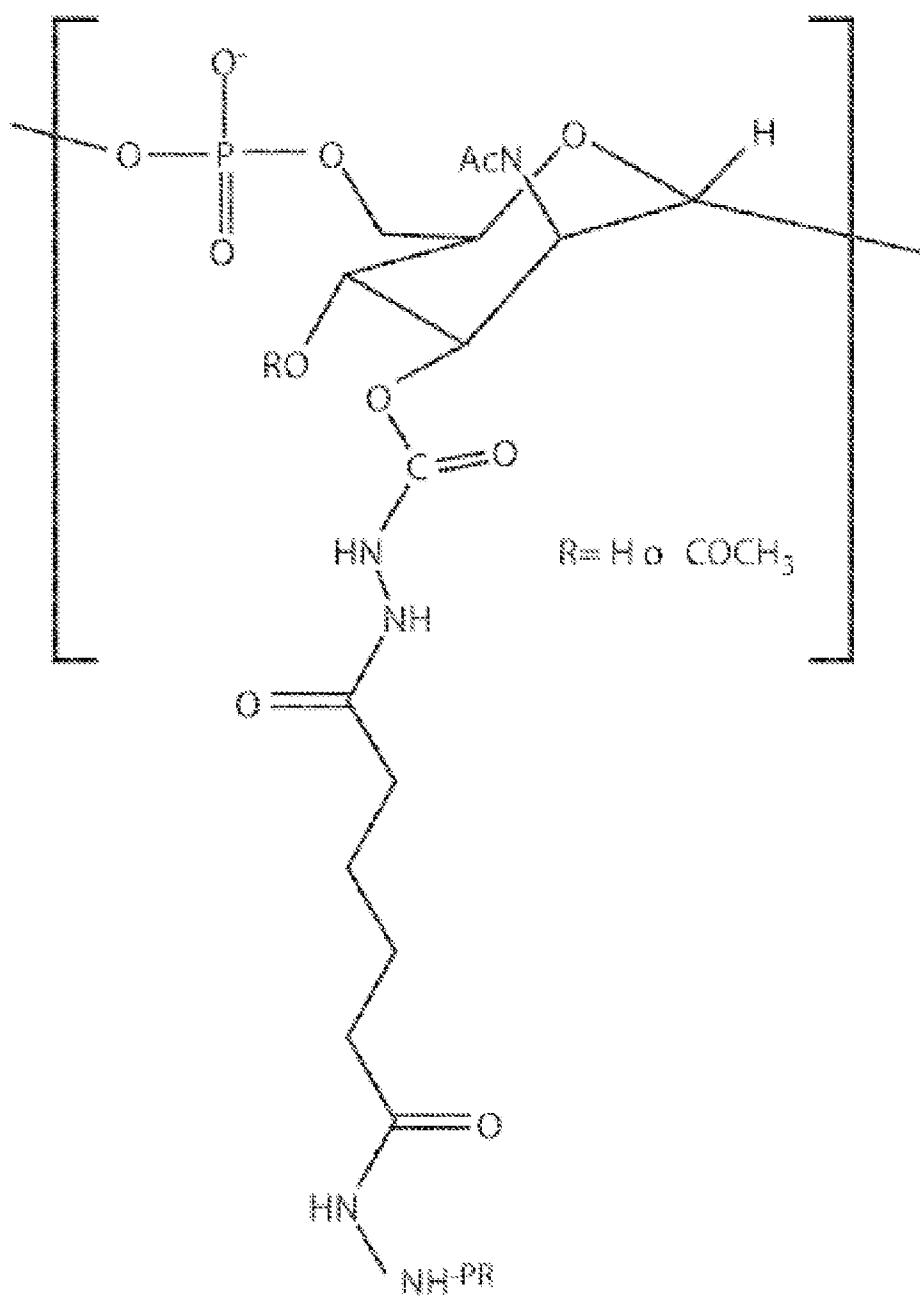
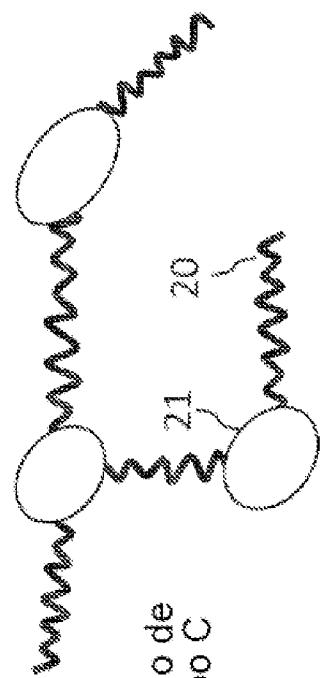


Fig. 1H



Conjugado de serogrupo C

Fig. 2A

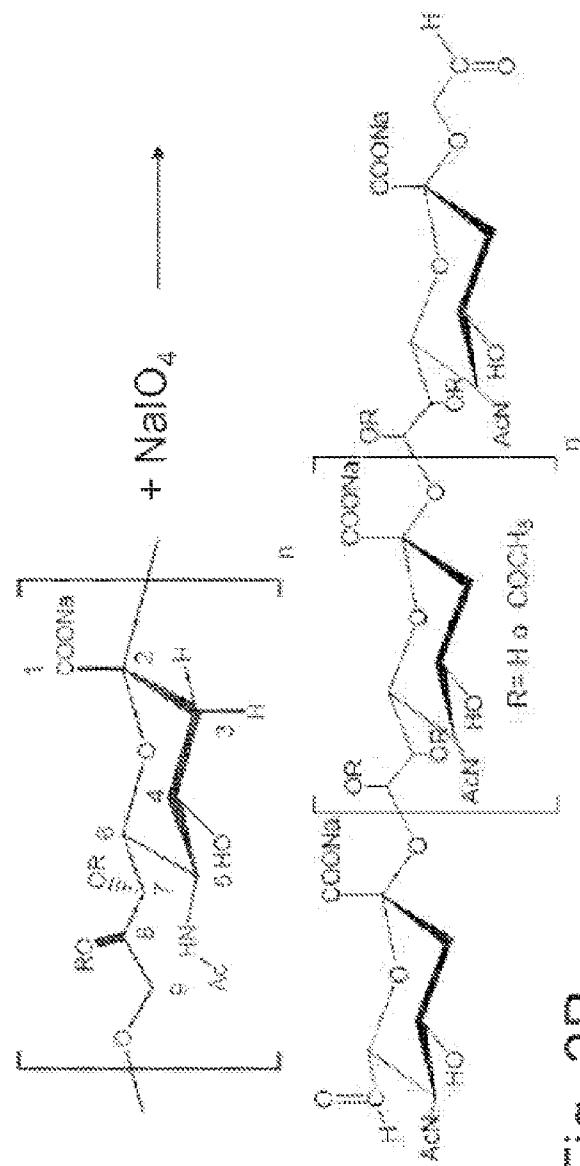


Fig. 2B

Fig. 2D

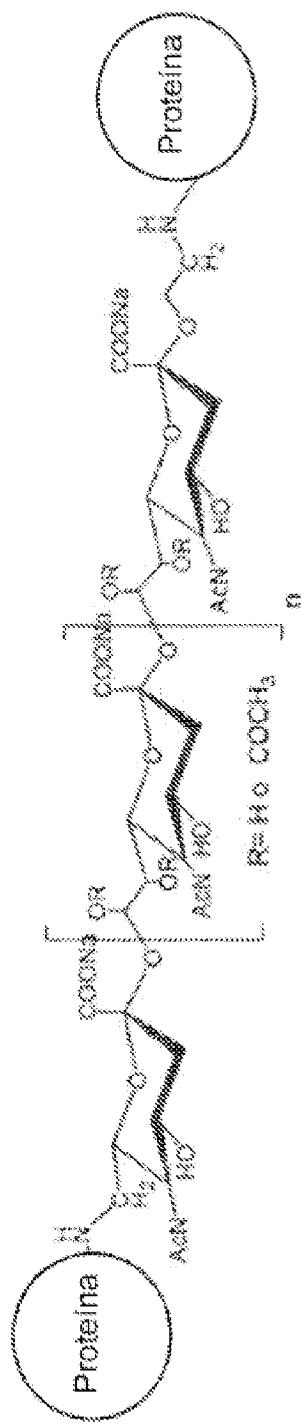


Fig. 2C

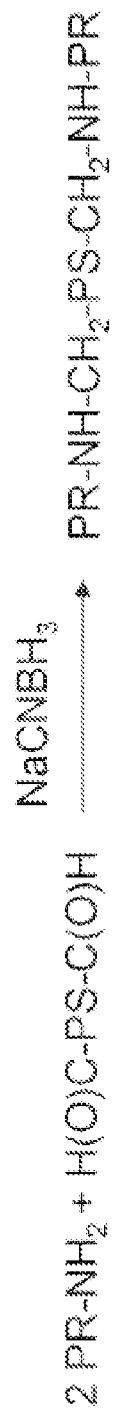


Fig. 3
Conjugado de
serogrupo W135 o Y

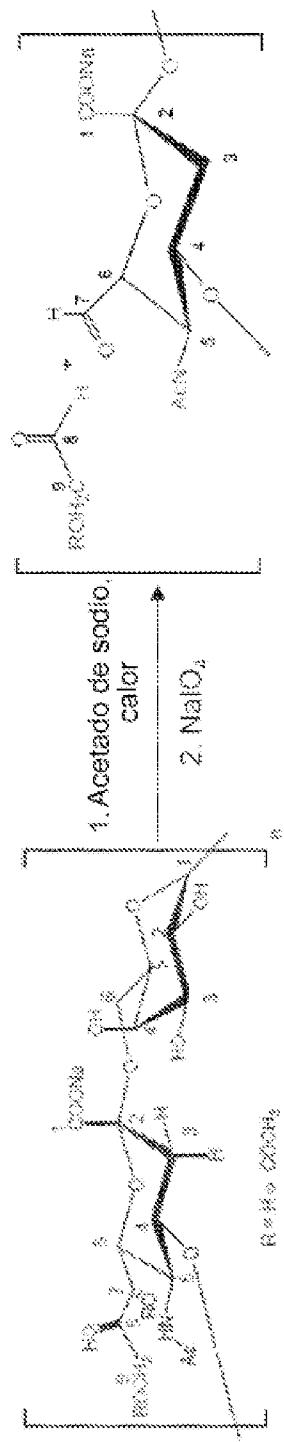
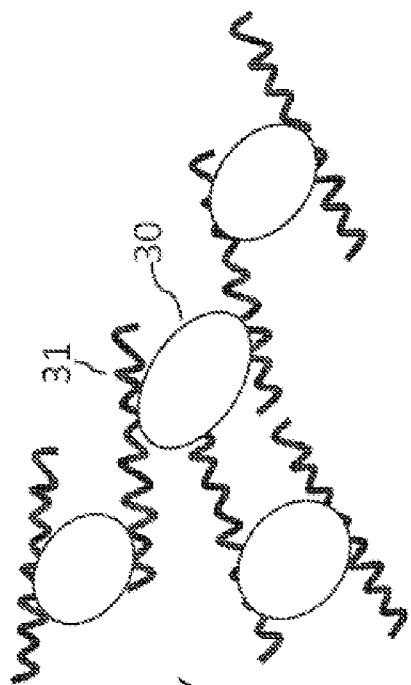


Fig. 4A



Fig. 4B

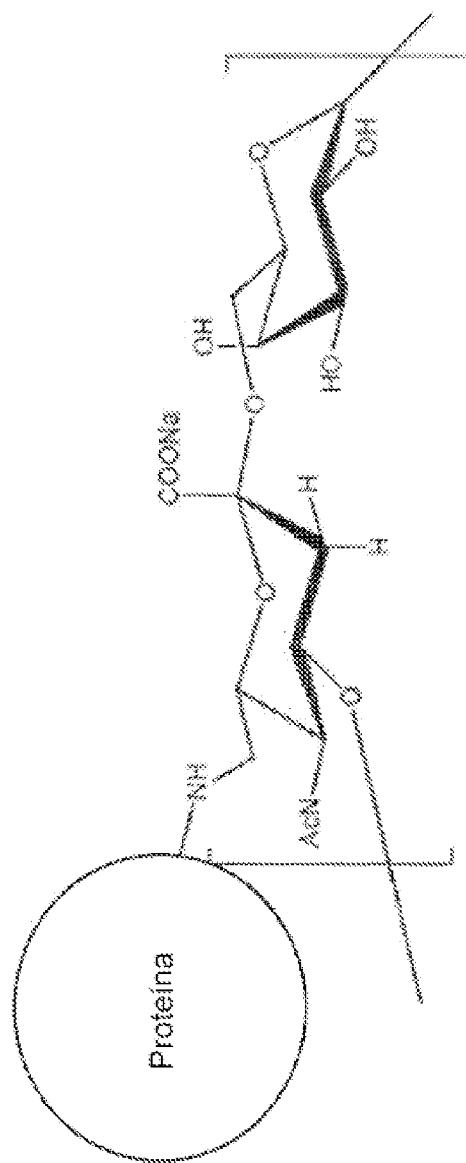


Fig. 4C

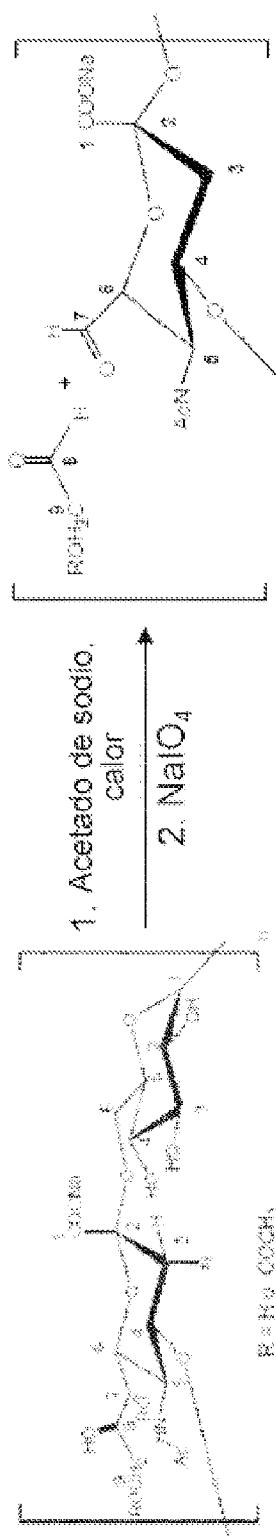


Fig. 5A

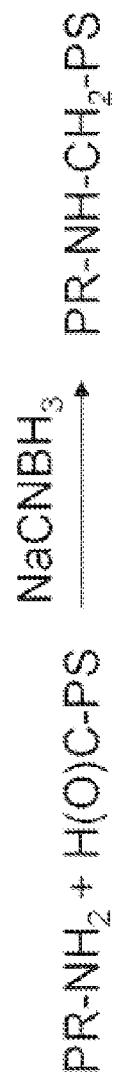


Fig. 5B

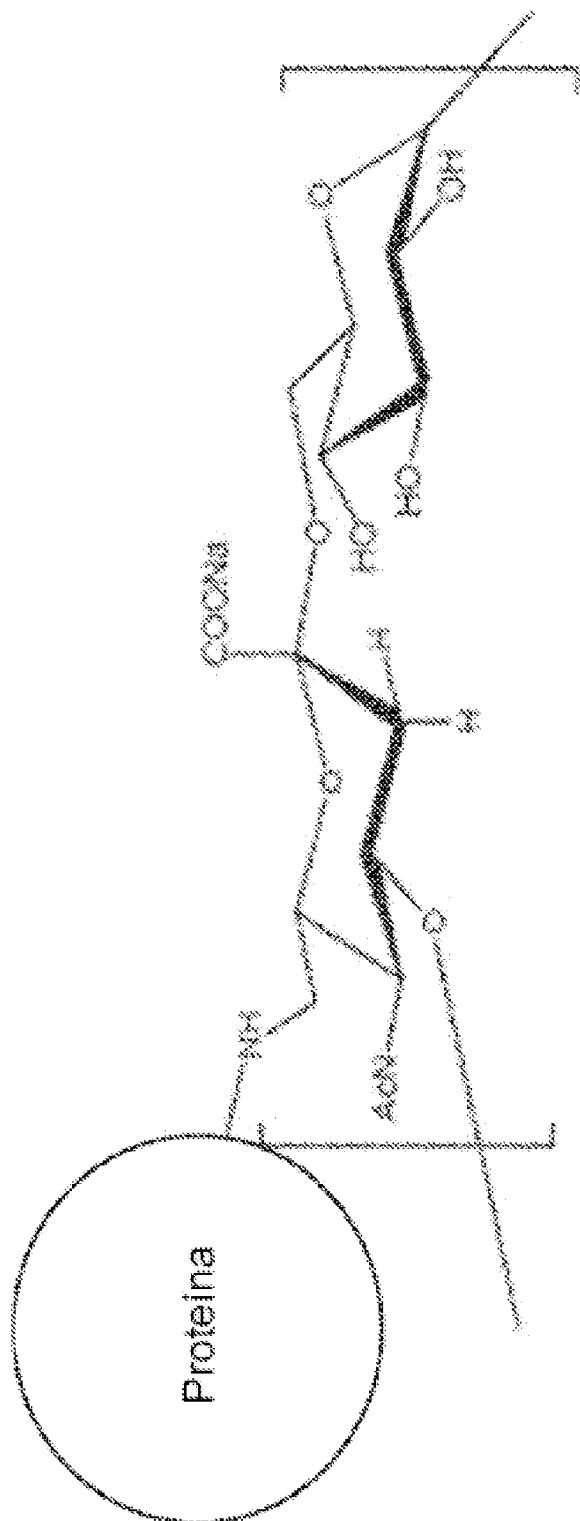
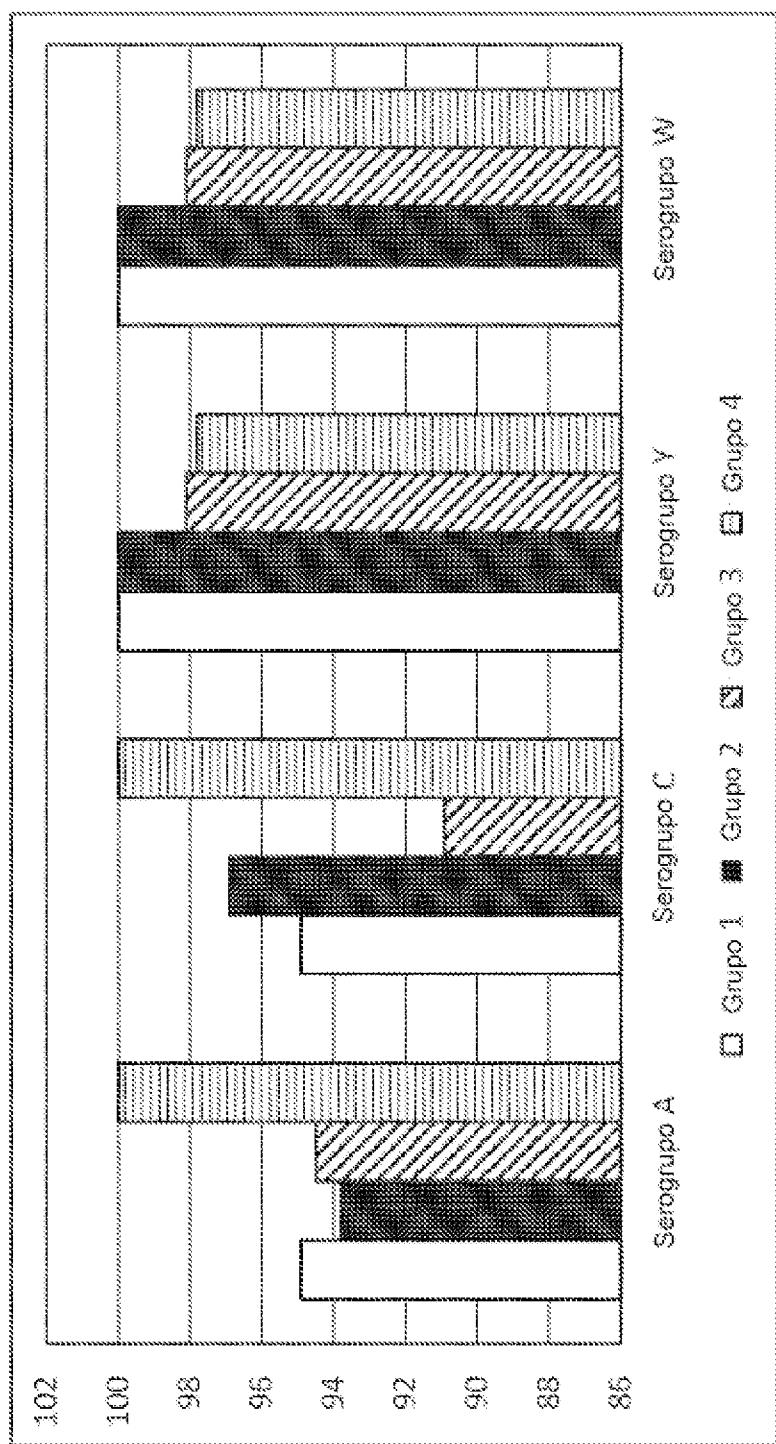
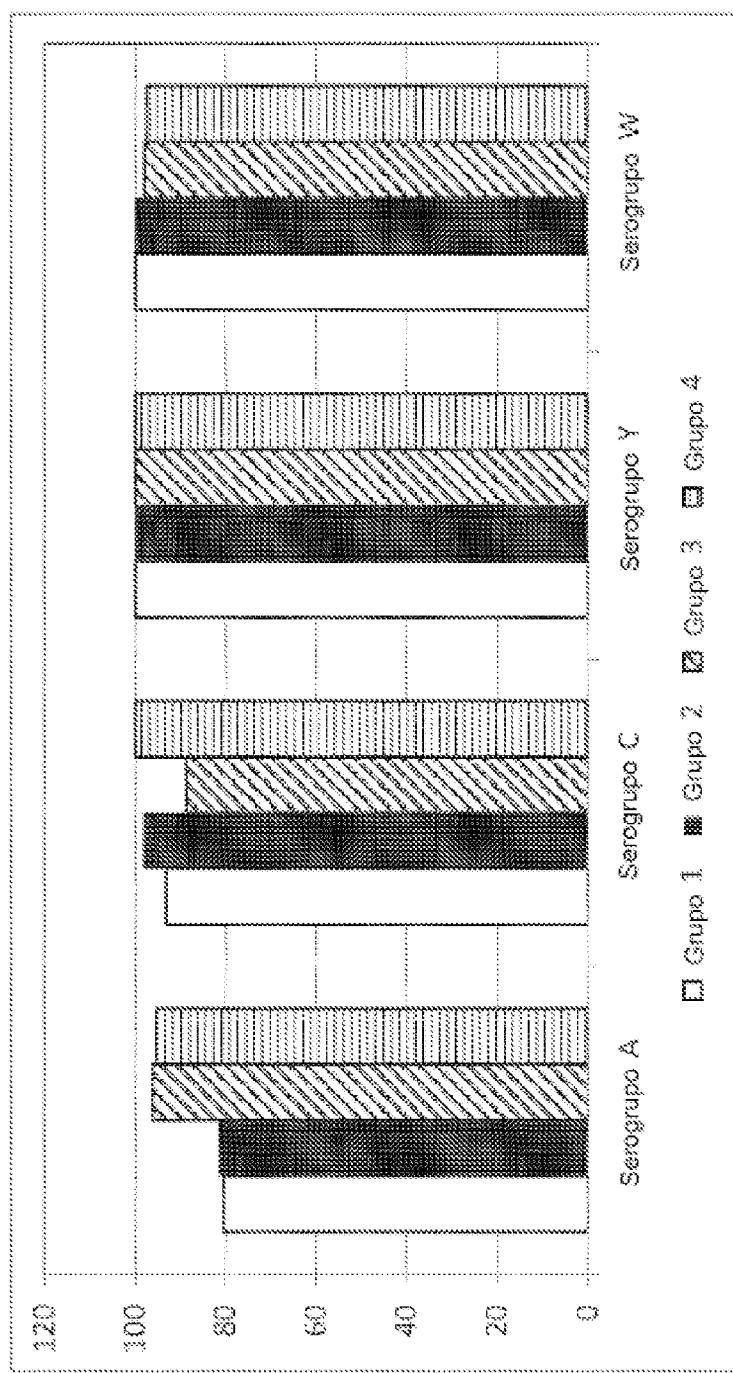


Fig. 5C



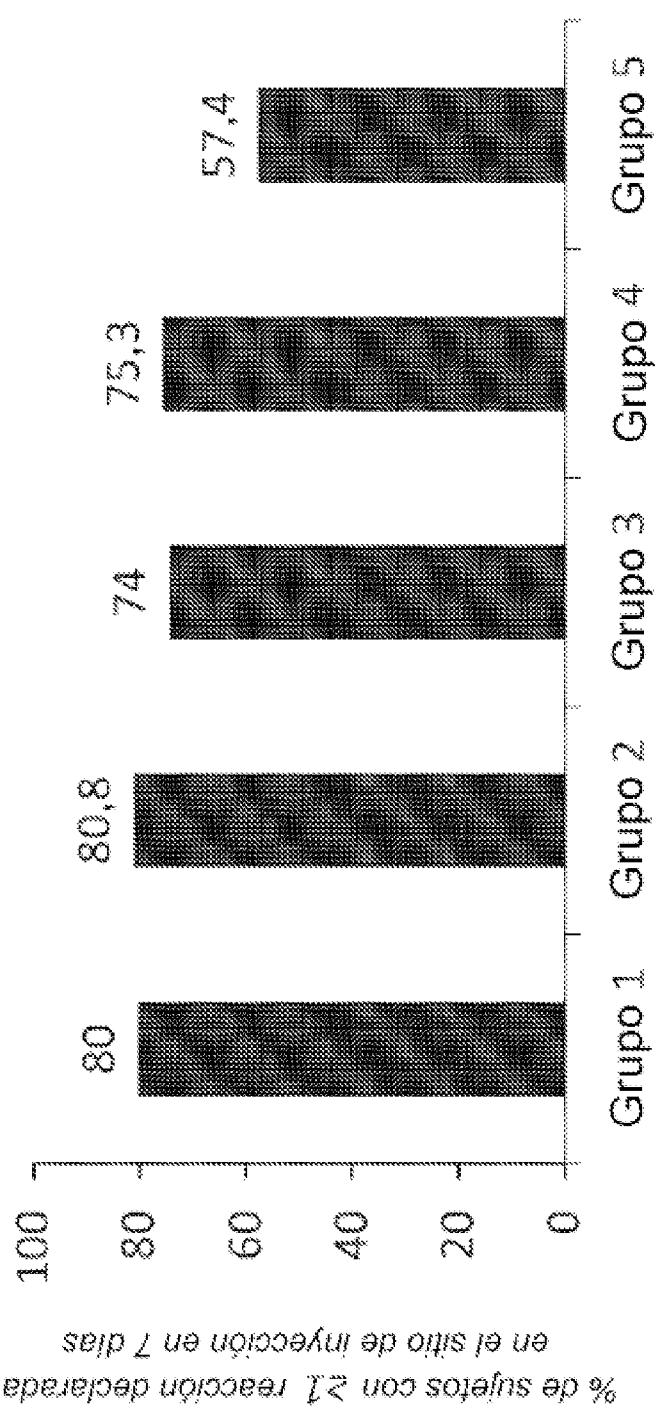
% de sujetos con concentraciones de hSBA >= 1.8

Fig. 6



% de sujetos con concentraciones de rSBA $\geq 1:8$

Fig. 7



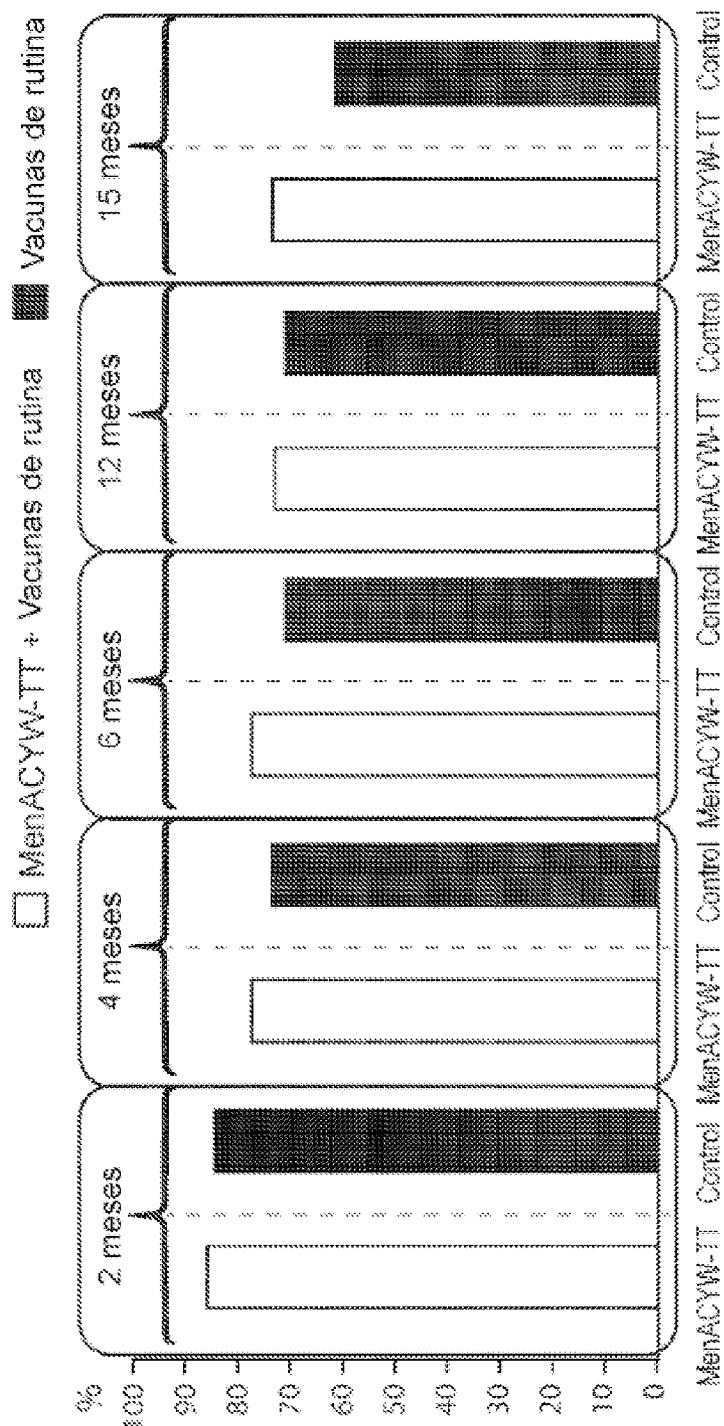


Fig. 9

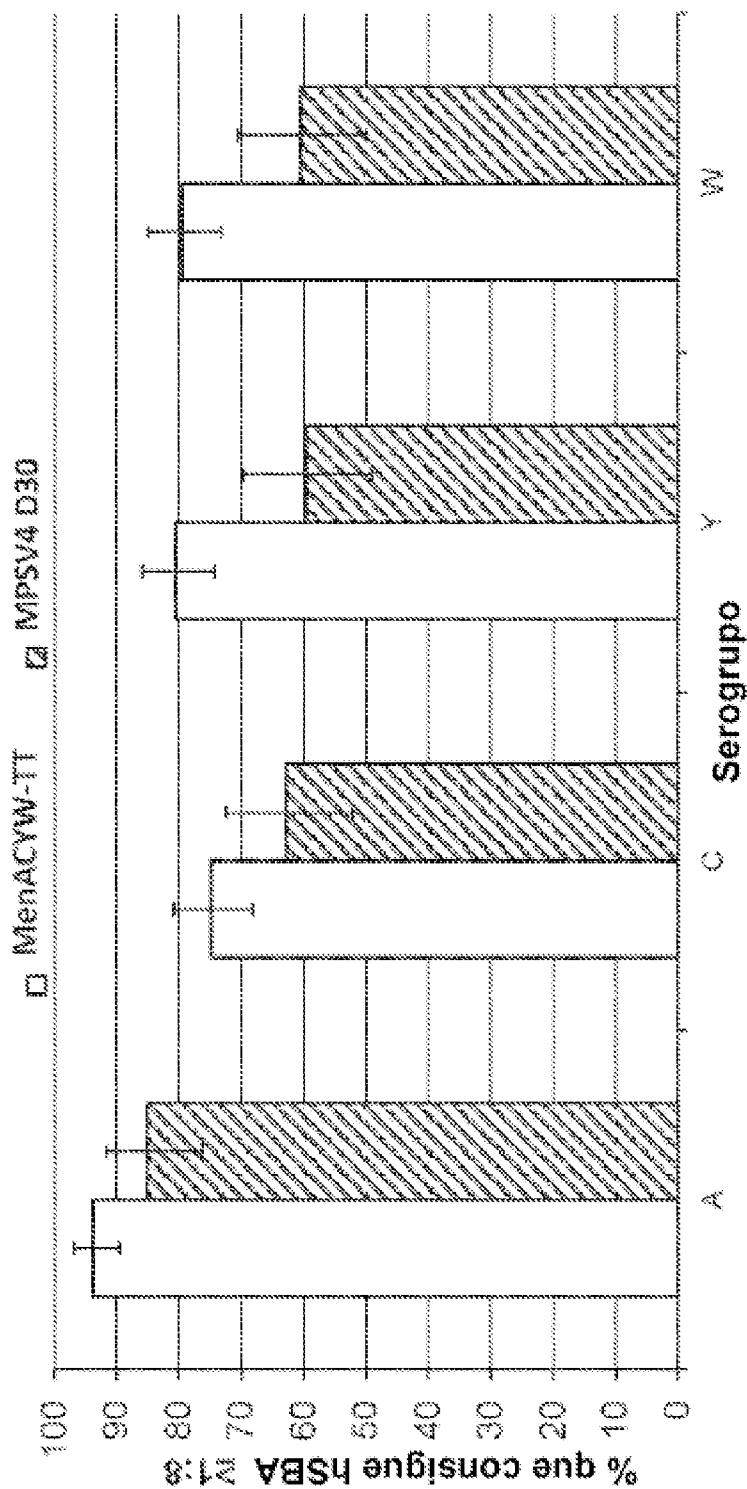


Fig. 10

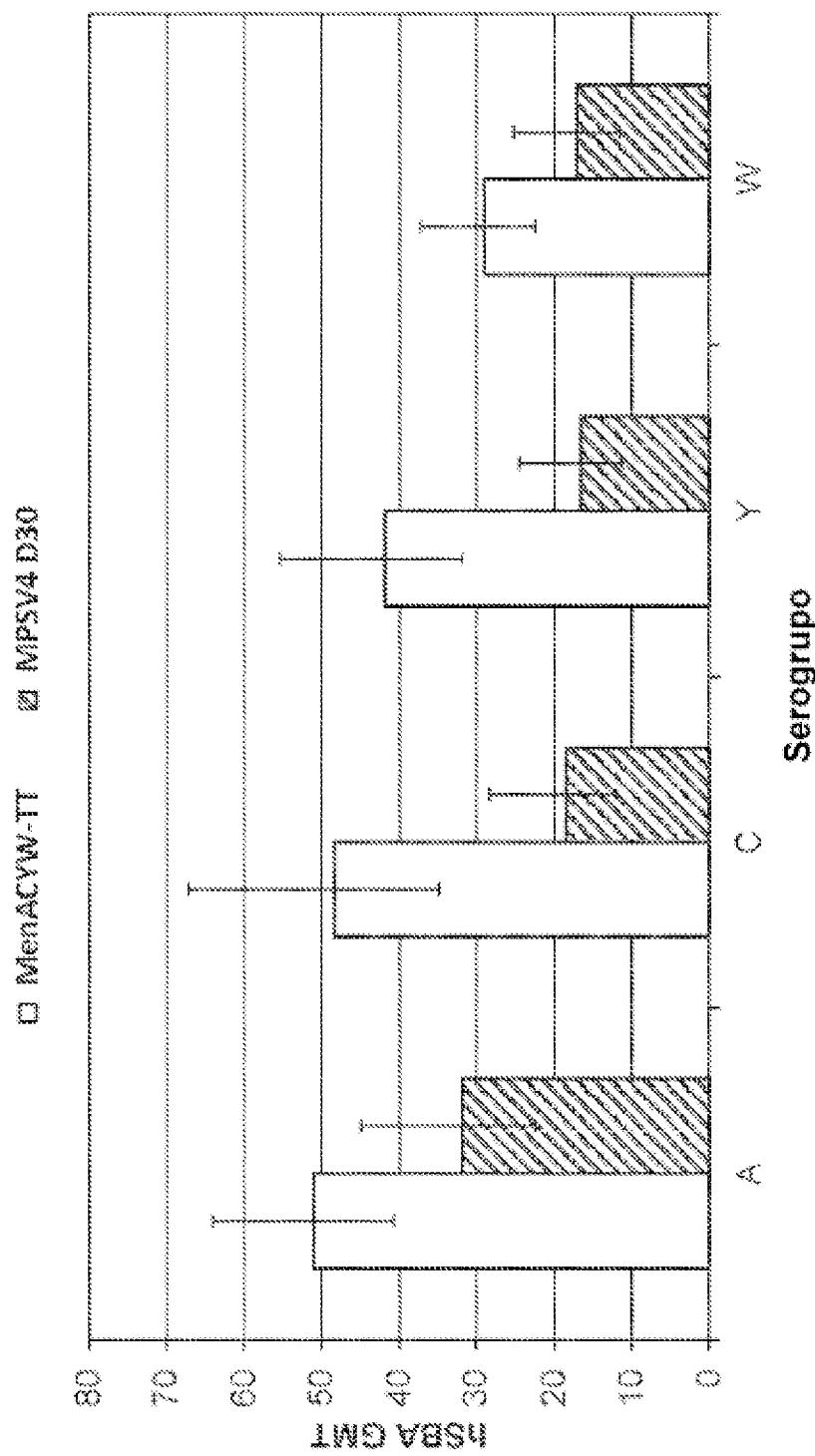


Fig. 11

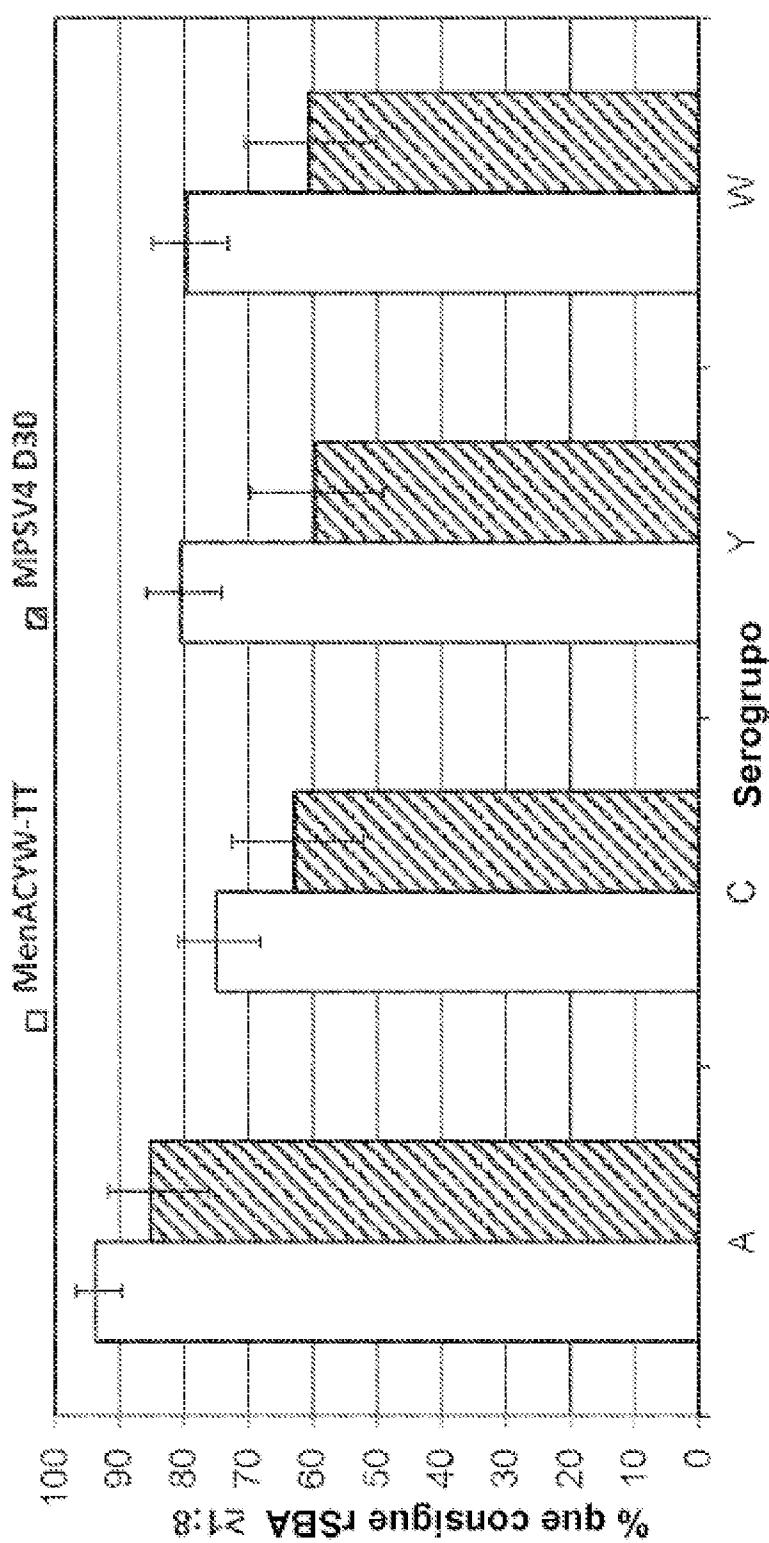


Fig. 12

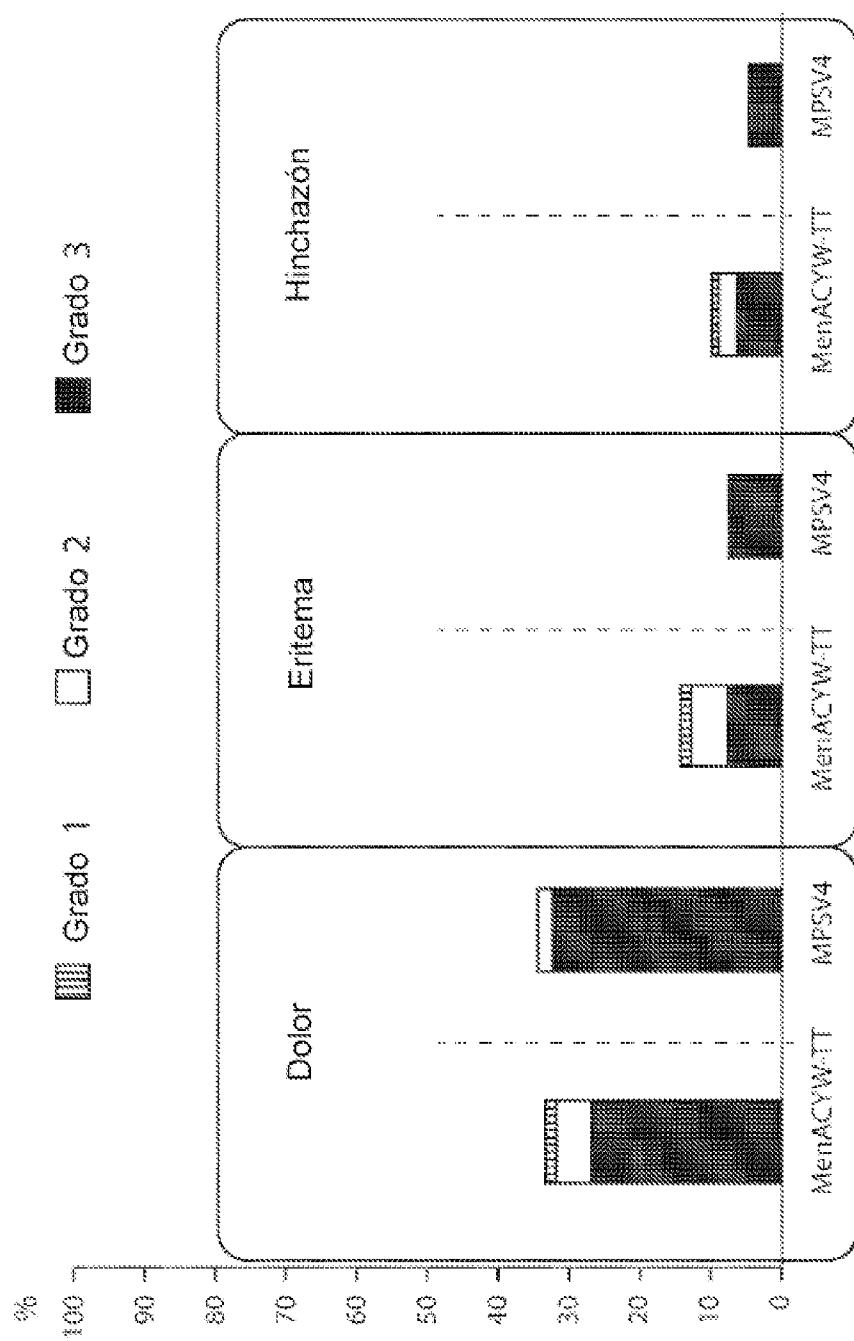


Fig. 13

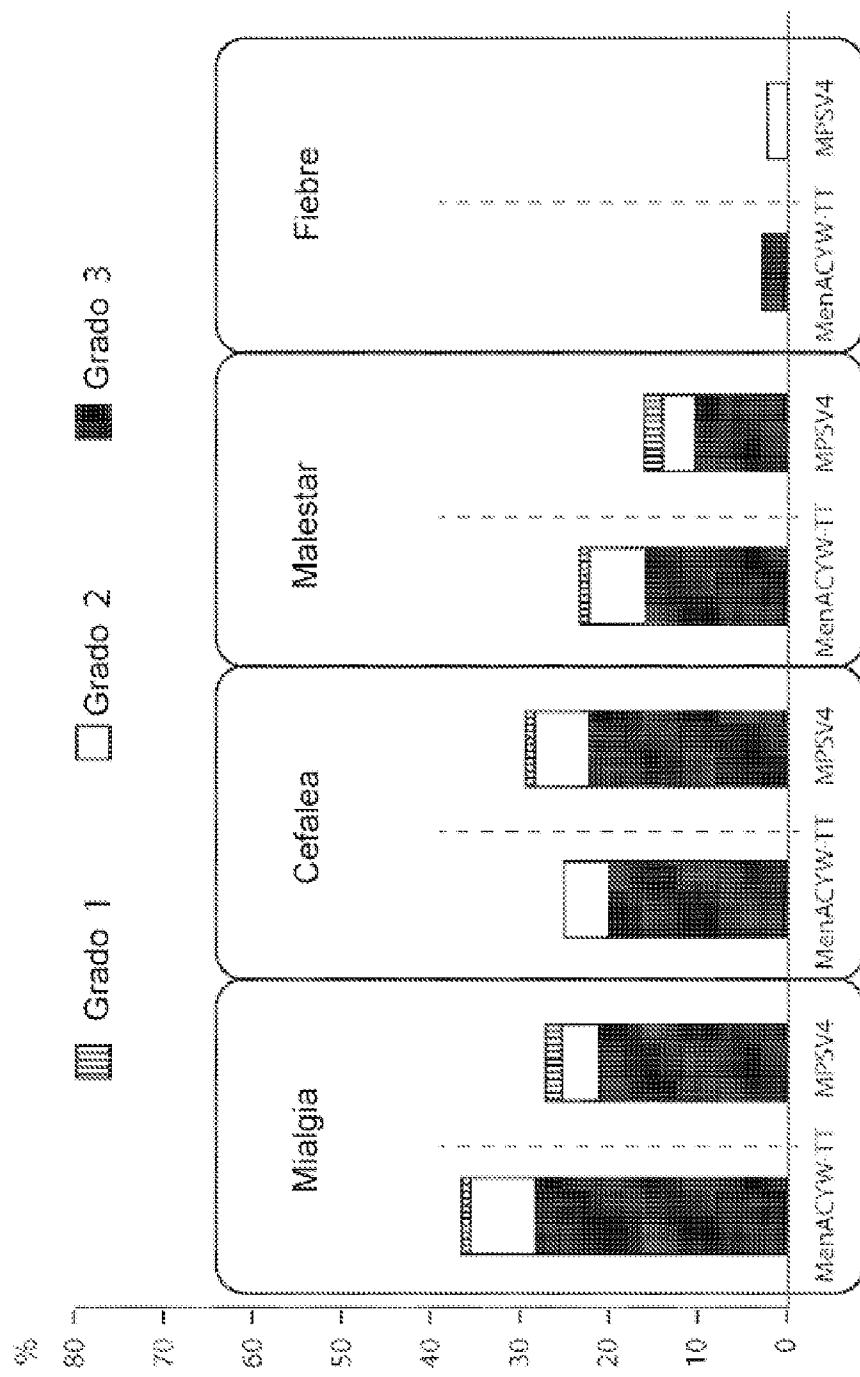


Fig. 14

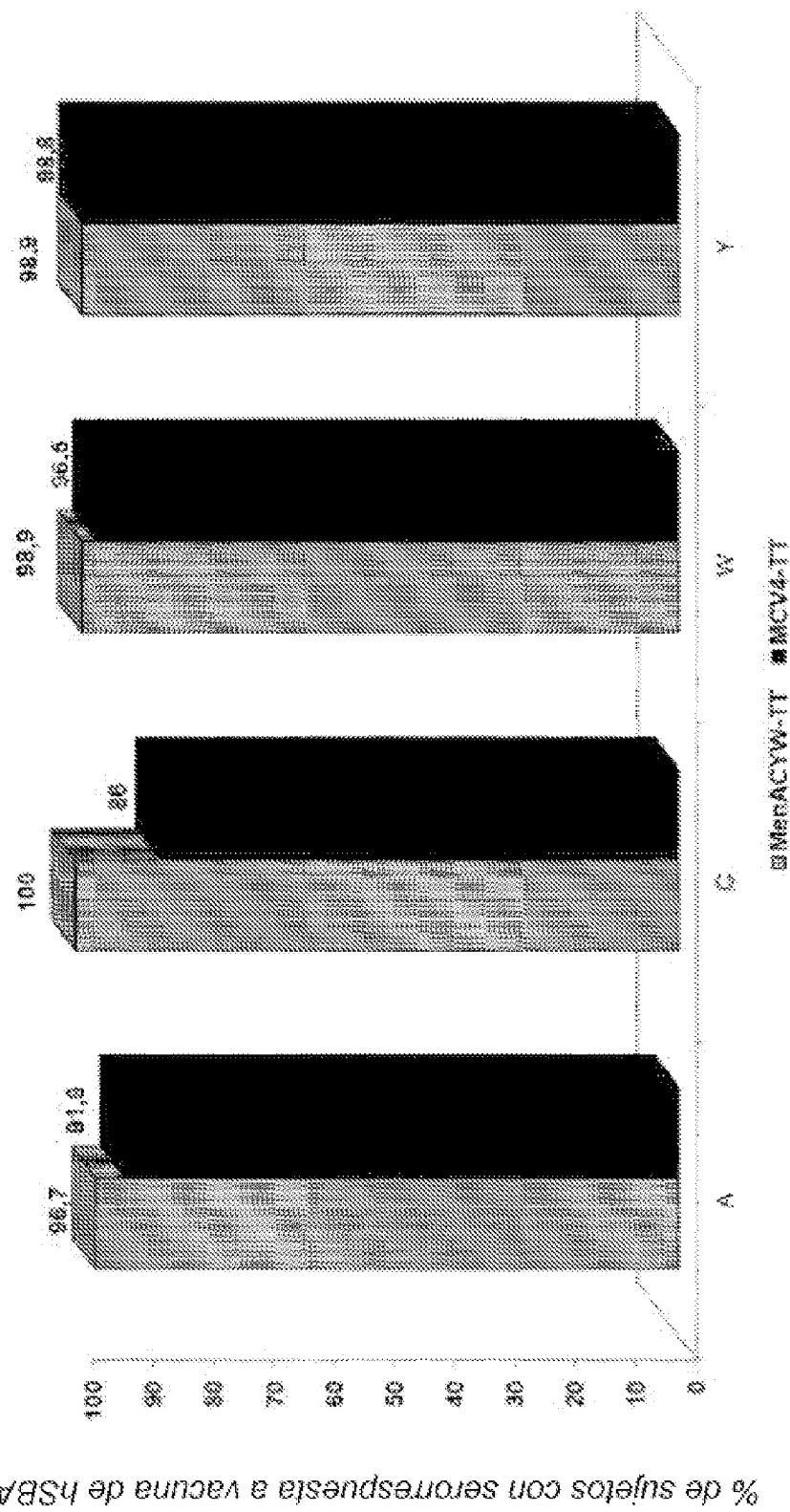


Fig. 15

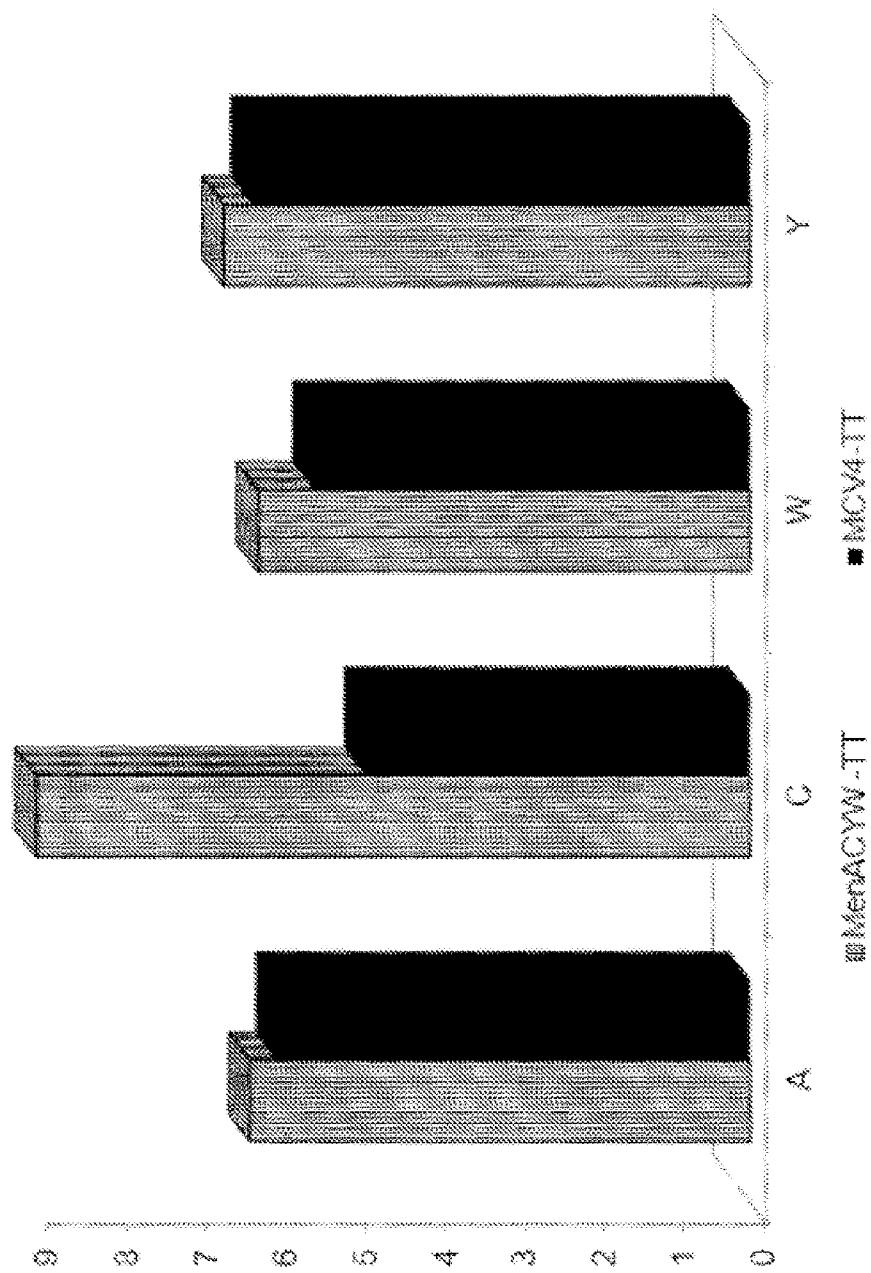


Fig. 16

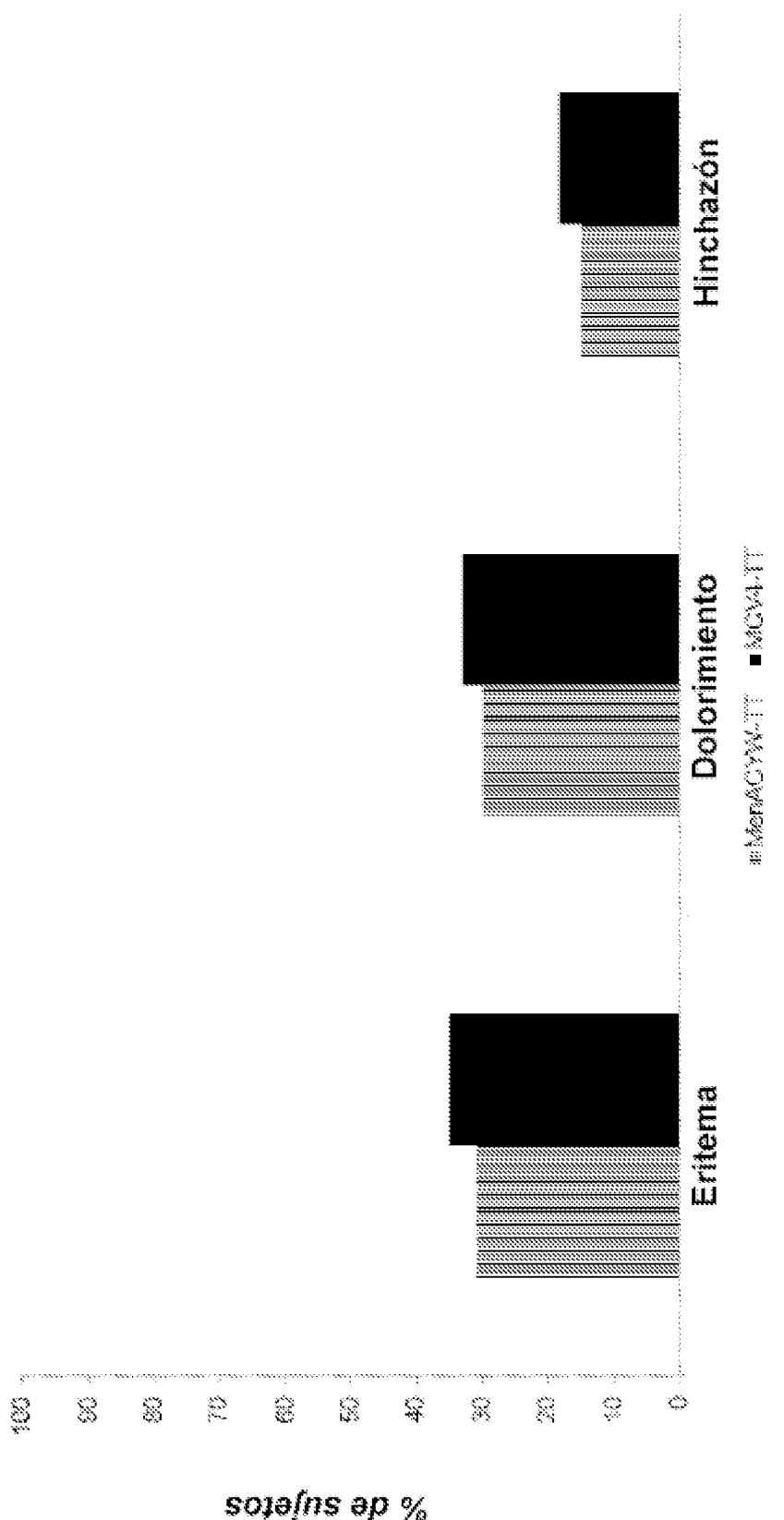


Fig. 17

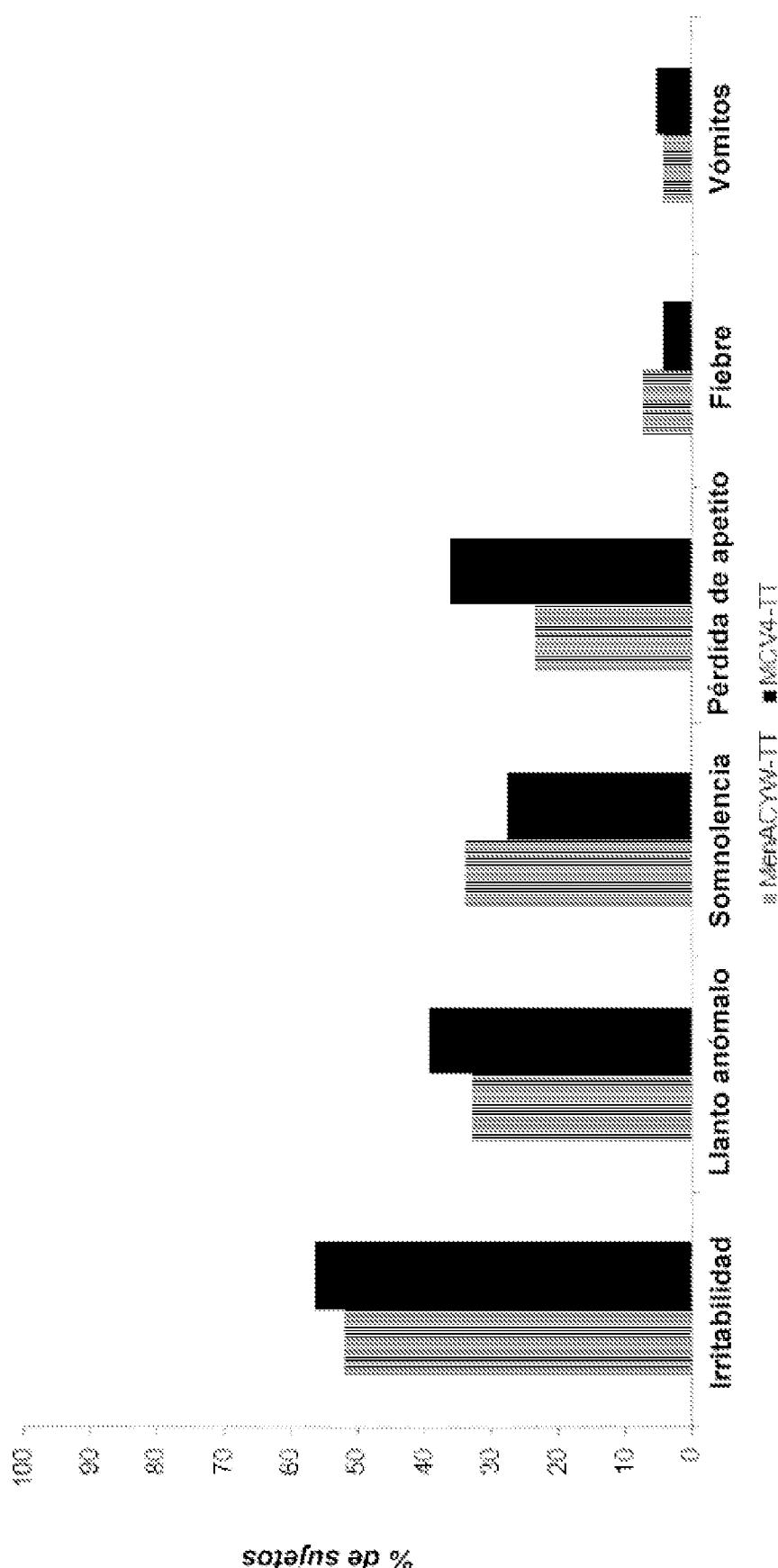


Fig. 18