



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 343 855**

⑮ Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **06700004 .2**

⑯ Fecha de presentación : **13.01.2006**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1835939**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2007**

⑭ Título: **Vacuna de conjugados meningocócica.**

⑩ Prioridad: **14.01.2005 GB 0500787**

⑬ Titular/es: **Novartis AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.08.2010

⑭ Inventor/es: **Marshall, Cameron, John**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.08.2010

⑭ Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 343 855 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 de conjugados meningocócica.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a vacunas contra *Neisseria meningitidis*. En particular, se refiere a vacunas basadas en sacáridos capsulares conjugados de múltiples serogrupos meningocócicos.

10 **Antecedentes de la técnica**

Basándose en el polisacárido capsular del organismo se han identificado doce serogrupos de *N. meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y, y Z). El grupo A es el patógeno que está implicado con más frecuencia en enfermedades epidémicas en el África subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la inmensa mayoría de los casos en 15 EEUU y en la mayoría de los países desarrollados. Los serogrupos W135 e Y son responsables del resto de casos en EEUU y en los países desarrollados.

20 Durante muchos años se ha conocido una vacuna tetravalente de polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, Y, y W135 [1, 2]. Aunque es eficaz en adolescentes y adultos induce una baja respuesta inmunológica y su protección tiene una duración corta y no puede utilizarse con niños [por ejemplo, referencia bibliográfica 3] porque los polisacáridos son antígenos independientes de células T que inducen una débil respuesta inmunológica que no puede reforzarse. Los polisacáridos de esta vacuna no están conjugados [4].

25 Las vacunas de conjugados contra el serogrupo C han sido aprobadas para su uso en seres humanos e incluyen Menjugate™ [5], Meningitec™ y NeisVac-C™. Se conocen mezclas de conjugados de los serogrupos A+C [6-8] y se han indicado mezclas de conjugados de los serogrupos A+C+W135+Y [9-13].

30 Aunque los conjugados meningocócicos son muy conocidos aún no se han introducido en los programas de inmunización pediátrica existentes, que en los países desarrollados implican, de forma típica: la vacuna de la hepatitis B en el momento del nacimiento; y, comenzando a los 2 meses, todas de difteria/tétanos/pertussis (D-T-P), conjugado de *H. influenzae* de tipo b (Hib), poliovirus inactivo y conjugados de pneumococos a los 2 meses.

35 Sin embargo, cuando se añaden vacunas de conjugados a los programas de inmunización existentes, debe solucionarse la cuestión de la supresión epitópica inducida por el vehículo (o “supresión por el vehículo”, como se conoce en general), en particular la supresión que surge del cebado del vehículo. La “supresión por el vehículo” es el fenómeno mediante el cual la preinmunización de un animal con una proteína vehículo evita que posteriormente produzca una respuesta inmunológica contra un nuevo epitopo antigénico que se presente sobre ese vehículo [14].

40 Como se indica en la referencia bibliográfica 15, cuando varios antígenos de vacuna contienen el mismo componente proteico (que se esté utilizando como inmunógeno y/o como proteína vehículo en un conjugado), entonces existe una posible interferencia entre estos antígenos. En la referencia bibliográfica 15, la respuesta inmunológica contra un antígeno que estaba conjugado con un vehículo toxoide del tétanos (Tt) fue suprimida por la inmunidad preexistente contra Tt.

45 La referencia bibliográfica 16 indica cómo una combinación de vacunas D-T-P con una vacuna de conjugado Hib fue afectada de manera adversa cuando el vehículo para ese conjugado Hib era el mismo que el antígeno del tétanos de la vacuna D-T-P. Los autores concluyeron que este fenómeno de “supresión por el vehículo”, que surge de la interferencia por un vehículo proteico habitual, debería tomarse en cuenta cuando se introducen vacunas que incluyan múltiples conjugados.

50 Por contraste con las referencias bibliográficas 15 y 16, la referencia bibliográfica 17 indica que el cebado con el toxoide del tétanos no tenía ningún impacto negativo sobre la respuesta inmunológica contra un conjugado de Hib-Tt administrado posteriormente, pero sí se observó supresión en pacientes con anticuerpos anti-Tt adquiridos por vía materna. Sin embargo, en la referencia bibliográfica 18, se indicó un efecto de “supresión epitópica” para un conjugado peptídico basado en Tt en pacientes con anticuerpos anti-Tt existentes como resultado de una vacunación contra el tétanos.

60 En la referencia bibliográfica 19 se sugiere que un conjugado que tiene CRM197 (un mutante detoxificado de la toxina de la difteria) como vehículo puede ser ineficaz en niños que no hayan recibido previamente la toxina de la difteria como parte de una vacuna (por ejemplo, como parte de una vacuna D-T-P o D-T). Este trabajo se desarrolló más a fondo en la referencia bibliográfica 20, en que se observó un efecto de cebado del vehículo por una inmunización D-T que persiste en la posterior inmunización con conjugados Hib.

65 En la referencia bibliográfica 21, los autores descubrieron que una preinmunización con una proteína vehículo de toxoide del tétanos o de difteria reducía el aumento en los niveles de anticuerpos anti-Hib después de la posterior inmunización con el sacárido capsular de Hib conjugado con estos vehículos, siendo igualmente afectados IgG1 e IgG2. También se suprimieron las respuestas a las porciones de vehículo de los conjugados. Además, se observó una supresión no específica de epitopo más general, así como se observó que una preinmunización con un conjugado

afectaba a las respuestas inmunológicas contra las porciones de vehículo y de sacárido de un segundo conjugado que se administra cuatro semanas más tarde.

El uso de diferentes proteínas vehículo en una única vacuna de conjugados pneumocócica multivalente se indica

- 5 en la referencia bibliográfica 22, utilizándose múltiples vehículos para evitar la supresión por el vehículo. Los autores predicen que existe una carga máxima de proteína vehículo que puede ser tolerada en una vacuna de conjugados multivalente sin que surja una interferencia negativa. En la referencia bibliográfica 23 se indica que vacunas de conjugados pneumocócicas que incluyen proteínas vehículo mezcladas produjeron, en paralelo a la respuesta antipneumocócica, unas respuestas de refuerzo no intencionadas contra los vehículos.

10 En la referencia bibliográfica 24, una investigación sobre si se podrían administrar refuerzos de difteria y de tétanos con conjugados del serogrupo C meningocócicos monovalentes, se descubrió que las valoraciones contra el conjugado meningocócico fueron menores cuando el vehículo era un vehículo de toxoide del tétanos y el paciente había recibido antes una inmunización con una vacuna que contenía tétanos.

15 Por último, la referencia bibliográfica 25 indica que "la exposición anterior a la proteína vehículo puede potenciar o suprimir la respuesta de anticuerpos a los polisacáridos administrados en los conjugados de sacáridos-proteínas". Los conjugados utilizados en la referencia bibliográfica 25 empleaban el toxoide del tétanos o el mutante CRM 197 como proteína vehículo.

20 Por tanto, la situación con respecto al cebado de vehículos y/o la supresión por el vehículo es confusa, y sigue sin estar claro si cualquier conjugado concreto producirá supresión por el vehículo o se beneficiaría de una potenciación de cebado del vehículo. Las vacunas de conjugados meningocócicas no estarán en posición para integrarse o añadirse a los programas de inmunización pediátrica existentes hasta que se haya solucionado esta cuestión. Además, como 25 los conjugados meningocócicos se administrarán como mezclas tetravalentes (es decir, cuatro conjugados diferentes), entonces el potencial de supresión por el vehículo es aún mayor.

Además del problema del cebado con un vehículo que tiene un impacto negativo sobre las respuestas inmunológicas contra los conjugados de sacáridos, también puede ocurrir a la inversa, es decir, la inmunización con un conjugado 30 puede tener un impacto negativo sobre las respuestas inmunológicas contra el vehículo [26].

El documento WO 03/094834 describe composiciones inmunogénicas que comprende (a) un antígeno de sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*, y (b) un adyuvante de quitosano. Se dice que las composiciones comprenden preferiblemente (c) uno o más antígenos diferentes y/o (d) uno o más adyuvantes diferentes. Se dice que las 35 composiciones son particularmente adecuadas para la administración mucosica, incluyendo la administración intranasal. El documento WO 03/094834 también describe composiciones inmunogénicas para la administración mucosica que comprenden sacáridos capsulares de al menos dos de los serogrupos A, C, W135 y Y de *N. meningitidis*. Se dice que para los sacáridos capsulares en las composiciones de la invención, se prefiere que estén conjugados con una proteína o proteínas vehículo y/o que sean oligosacáridos. Se dice que los antígenos de olisacáridos conjugados son 40 particularmente preferidos.

Descripción de la invención

La referencia bibliográfica 27 sugiere que la supresión por el vehículo en vacunas de conjugados meningocócicas 45 debe tratarse utilizando más de un tipo de proteína vehículo. En particular, la referencia bibliográfica 27 sugiere que la proteína D de *H. influenzae* debe utilizarse como proteína vehículo para conjugados meningocócicos, siendo también una posibilidad el toxoide del tétanos (Tt). Para evitar la supresión epitópica, la proteína D también es el vehículo preferido en la referencia bibliográfica 28. De forma similar, la referencia bibliográfica 29 sugiere que las fimbrias de *Bordetella pertussis* deberían utilizarse como vehículo para evitar la supresión por el vehículo en vacunas de conjugados multivalentes. Por contraste, la invención emplea el toxoide del tétanos (Tt) como vehículo para conjugados de 50 sacáridos meningocócicos mezclados.

Además, la referencia bibliográfica 27 también sugiere que las vacunas de conjugados meningocócicas deben administrarse al mismo tiempo que las vacunas D-T-P-Hib (por ejemplo, véase el ejemplo 3), de forma que no exista una 55 exposición previa a la proteína vehículo de los conjugados meningocócicos. Por contraste, ahora se ha descubierto que los conjugados meningocócicos pueden administrarse a pacientes incluso cuando éstos ya hayan recibido la proteína vehículo, en forma de un inmunógeno previo (por ejemplo, en una inmunización D-T-P o D-T) o como una proteína vehículo previa (por ejemplo, en una vacuna de conjugados Hib o de conjugados pneumocócica). El estudio previo de la supresión epitópica inducida por el vehículo en vacunas de conjugados del serogrupo C monovalentes [24] no buscó el efecto de la administración anterior de conjugados, si la hubo.

Además, también en contraste con la referencia bibliográfica 27, la capacidad de un paciente para producir una respuesta inmunológica contra un conjugado meningocócico, incluso si ya ha recibido un conjugado diferente, contrasta con la referencia bibliográfica 21.

60 Por tanto, la invención proporciona una composición que comprende al menos dos de: (a) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos; (b) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos; (c) un conjugado de (i) el sacárido capsular

del serogrupo W135 de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos; y (d) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos, para su uso en un procedimiento para inmunizar a un paciente contra una enfermedad provocada por *Neisseria meningitidis*, que comprende la etapa de administrar al paciente la composición, habiendo sido el paciente preinmunizado con (a) un toxoide del tétanos y/o (b) un conjugado de (i) un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos.

La invención también proporciona el uso de al menos dos de: (a) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos; (b) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos; (c) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo W135 de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos; y (d) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos, para la fabricación de un medicamento para inmunizar a un paciente contra una enfermedad provocada por *Neisseria meningitidis*, en el que el paciente ha sido preinmunizado con (a) un toxoide del tétanos y/o (b) un conjugado de (i) un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos.

La enfermedad meningocócica es preferiblemente meningitis, más preferiblemente meningitis bacteriana, y lo más preferiblemente meningitis meningocócica. Por tanto, la invención puede utilizarse para proteger contra infecciones meningocócicas que provocan meningitis.

20 *El paciente preinmunizado*

El paciente que se va a inmunizar se ha preinmunizado con: (a) un toxoide del tétanos y/o (b) un conjugado de (i) un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos. La preinmunización típica incluye: un antígeno del toxoide del tétanos; un conjugado de sacárido capsular Hib que emplea un vehículo de toxoide del tétanos; y/o un conjugado de sacárido capsular pneumocócico que emplea un vehículo de toxoide del tétanos.

El paciente habrá recibido al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 ó más) dosis del antígeno o antígenos de preinmunización, y esta dosis (o la dosis más temprana de múltiples dosis) se habrá administrado al paciente al menos seis (por ejemplo, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 36, 48, 60, 120, 180, 240, 300 o más) meses antes de la inmunización con los conjugados meningocócicos según la invención. En un grupo de pacientes preferido, la preinmunización se realizó a los 3 años desde el nacimiento, por ejemplo, a los 2 años desde el nacimiento, al año desde el nacimiento, a los seis meses desde el nacimiento, o incluso a los 3 meses, 2 meses o un mes desde el nacimiento.

El paciente que se va a inmunizar según la invención será, de forma típica, un ser humano. El ser humano tiene, en general, al menos un mes de edad, por ejemplo, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 2 años, al menos 5 años, al menos 11 años, al menos 17 años, al menos 40 años, al menos 55 años, etc. Un grupo de pacientes preferido tiene al menos 6 meses de edad. Otro grupo de pacientes preferido está en el grupo de edad de 2-55 años, y otro grupo de pacientes preferido está en el grupo de edad de 11-55 años. Otro grupo de pacientes preferido tiene menos de 11 años, por ejemplo 2-11 años. Sin embargo, en todos los casos, independientemente de la edad, el paciente habrá sido preinmunizado como se define en la presente.

El paciente habrá recibido, de forma típica, un toxoide del tétanos en forma del antígeno "T" en una inmunización D-T-P o D-T. Estas inmunizaciones se administran, de forma típica, a niños y niñas recién nacidos con 2, 3 y 4 meses. Cuando la inmunización incluye una vacuna de pertussis, esta vacuna puede ser una vacuna de pertussis de células completas o celular ("Pw") pero preferiblemente es una vacuna de pertussis acelular ("Pa"). La preinmunización con vacunas Pa en general incluye uno, dos o tres de los siguientes antígenos de *B. pertussis* muy conocidos y bien caracterizados: (1) el toxoide de pertussis ("PT"), detoxificado por medios químicos o mediante mutagénesis dirigida específica de sitio, por ejemplo el mutante "9K/129G" [30]; (2) hemaglutinina filamentosa ("FHA"); (3) pertactina (también denominada "proteína de la membrana externa de 69 kDa"). Las vacunas de pertussis acelulares también pueden incluir aglutinógeno 2 y/o aglutinógeno 3. El antígeno "D" en una preinmunización D-T-P es, de forma típica, un toxoide de la difteria.

El paciente también, o como alternativa, habrá recibido el toxoide del tétanos como la proteína vehículo de un conjugado de proteína-sacárido. Estos conjugados incluyen el conjugado Hib "PRP-T" [véase la tabla 14-7 de la referencia bibliográfica 31], por ejemplo los productos ActHIB™, OmniHIB™ e HIBERIX™. El paciente también ha podido ser preinmunizado con un conjugado meningocócico del serogrupo C ("MenC"). Los conjugados MenC que emplean un vehículo de toxoide del tétanos incluyen el producto NeisVac-C™. Sin embargo, preferiblemente el paciente habrá sido preinmunizado con un conjugado Hib y/o pneumocócico pero no con un conjugado MenC. Si el paciente ha sido preinmunizado con un conjugado MenC, entonces la vacuna administrada según la invención puede o no incluir un conjugado del serogrupo C.

Cuando la preinmunización se hubo realizado con un antígeno conjugado, entonces el paciente casi inevitablemente también habrá recibido una pequeña cantidad del toxoide del tétanos libre como resultado de una contaminación de bajo nivel del conjugado (por ejemplo, provocada por la hidrólisis del conjugado durante el almacenamiento), pero esta pequeña cantidad, de forma típica, no es la adecuada para proporcionar una respuesta inmunológica significativa.

5 El toxoide del tétanos es una proteína muy conocida y bien caracterizada (por ejemplo, véase el capítulo 13 de la referencia bibliográfica 31) que puede obtenerse mediante la inactivación de la endopeptidasa (“toxina del tétanos”) producida por *Clostridium tetani*. La toxina puede tratarse para producir un toxoide que ya no es tóxico pero que sigue siendo antigenico y es capaz de estimular la producción de anticuerpos antitoxina específicos después de una inyección. Los toxoides del tétanos preferidos son los preparados mediante un tratamiento con formaldehído. El toxoide del tétanos puede obtenerse cultivando *C. tetani* en medio de crecimiento (por ejemplo, un medio Latham derivado de caseína bovina), seguido de un tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material entonces puede tratarse mediante un proceso que comprende la esterilización mediante filtración y/o la diálisis. La expresión “toxoide del tétanos”, tal como se emplea en la presente, incluye derivados del toxoide del tétanos que siguen presentando 10 reacción cruzada inmunológica con el toxina del tétanos.

15 El resultado de la preinmunización es que el sistema inmunológico del paciente ha sido expuesto a los antígenos de preinmunización. Esto significa en general que el paciente habrá generado una respuesta de anticuerpos anti-Tt (de forma típica para producir una valoración anti-Tt > 0,01 IU/ml) y poseerá linfocitos B y/o T de memoria específicos para Tt, es decir, una preinmunización es adecuada, de forma típica, para provocar una respuesta inmunológica anti-Tt anamnésica en el paciente. En una preinmunización en que Tt es un vehículo para un sacárido dentro de un conjugado, la preinmunización habrá generado una respuesta antisacárido y el paciente poseerá linfocitos B y/o T de memoria específicos para el sacárido, es decir, la preinmunización es adecuada, de forma típica, para provocar una respuesta inmunológica antisacárido anamnésica en el paciente. La preinmunización es preferiblemente adecuada para provocar 20 una inmunidad protectora en el paciente, por ejemplo, contra la enfermedad del tétanos o contra el organismo que contiene el sacárido, respectivamente.

25 Por tanto, los pacientes que van a inmunizar según la presente invención son diferentes de los pacientes en general, puesto que son miembros de un subgrupo de la población general cuyos sistemas inmunológicos ya han desarrollado una respuesta inmunológica contra los antígenos de la preinmunización, de forma que la inmunización según la invención con un conjugado meningocócico que incluye un vehículo de toxoide del tétanos provoca una respuesta inmunológica diferente en el subgrupo que en pacientes que previamente no han desarrollado una respuesta inmunológica contra los antígenos de la preinmunización. Los pacientes que han sido preinmunizados con Tt como vehículo de un conjugado (en particular de un conjugado Hib) son preferidos. Los pacientes particularmente preferidos se han 30 preinmunizado con Tt como vehículo de un conjugado y también con Tt como inmunógeno no conjugado.

35 Además de haber sido preinmunizado con un toxoide del tétanos, en forma conjugada o no conjugada, el paciente puede haber sido preinmunizado con otros antígenos. Estos antígenos incluyen, pero no se limitan a: un antígeno o antígenos de pertussis (véase anteriormente); el toxoide de la difteria (véase anteriormente); *Haemophilus influenzae* de tipo B (véase anteriormente); el antígeno de la superficie de la hepatitis B (HBsAg); poliovirus, como una vacuna de poliovirus inactivada (IPV); *Streptococcus pneumoniae* (véase anteriormente); virus de la gripe; BCG; antígenos del virus de la hepatitis A; virus del sarampión; virus de las paperas; virus de la rubéola; virus de la varicela; etc.

40 El paciente puede haber sido o no preinmunizado con uno o más conjugados meningocócicos. En algunas realizaciones preferidas, en el momento en que un paciente recibe por primera vez un conjugado meningocócico, el paciente ya ha sido preinmunizado con Tt. En otras realizaciones, un conjugado meningocócico se administra a un paciente que ya ha sido preinmunizado con (i) Tt y con (ii) un conjugado meningocócico.

45 *Los conjugados*

45 La invención inmuniza a pacientes con sacáridos conjugados. La conjugación se emplea para potenciar la inmunogenicidad de los sacáridos, puesto que los convierte de antígenos independientes de T en antígenos dependientes de T permitiendo, con ello, el cebado para una memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas (por ejemplo, referencia bibliográfica 32) y es una técnica muy conocida [por ejemplo, analizada 50 en las referencias bibliográficas 33 a 41].

55 La composición utilizada según la invención comprende al menos dos conjugados meningocócicos, en los que cada conjugado comprende una proteína vehículo de toxoide del tétanos (o su derivado), y el sacárido capsular. Los sacáridos capsulares se eligen de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, de forma que las composiciones incluyen sacáridos de 2, 3 o los 4 serogrupos. Las composiciones específicas comprenden sacáridos de los serogrupos A y C; los serogrupos A y W135; los serogrupos A e Y; los serogrupos C y W135; los serogrupos C e Y; los serogrupos W135 e Y; los serogrupos A y C y W135; los serogrupos A y C e Y; los serogrupos A y W135 e Y; los serogrupos C y W135 e Y; los serogrupos A y C y W135 e Y. Las composiciones que incluyen sacáridos de los cuatro serogrupos son las más preferidas.

60 Los sacáridos capsulares de cada uno de estos cuatro serogrupos están bien caracterizados. El sacárido capsular del serogrupo A meningocócico es un homopolímero del N-acetil-D-manosamina-1-fosfato con enlaces ($\alpha 1 \rightarrow 6$), con una O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. Los grupos acetilo pueden estar reemplazados por grupo bloqueante para evitar la hidrólisis [42], y estos sacáridos modificados siguen siendo sacáridos del serogrupo A dentro del significado de la presente invención. El sacárido capsular del serogrupo C es un homopolímero de ácido siálico con enlaces ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (ácido N-acetilneuramínico o “NeuNac”). La mayoría de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en C-7 y/o C-8 de los restos ácido siálico, pero aproximadamente 15% de los aislados clínicos carecen de estos grupos O-acetilo [43, 44]. La estructura del sacárido es escrita como $\rightarrow 9\text{-Neu}p\text{NAc} 7/8$

5 OAc-(α 2 →). El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades de ácido siálico-disacárido galactosa. Al igual que el sacárido del serogrupo C, tiene una O-acetilación variable pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [45]. La estructura se escribe como: →4)D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2→6)-D-Gal- α -(1→). El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto que la unidad repetida de disacárido incluye glucosa en lugar de galactosa. Como el serogrupo W135, tiene una O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [45]. La estructura del serogrupo Y se escribe como: →4)D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2 → 6)-D-Glc- α -(1→).

10 Los sacáridos utilizados según la invención pueden estar O-acetilados como se describió anteriormente (por ejemplo, con el mismo patrón de O-acetilación que el observado en sacáridos capsulares nativos), o pueden estar parcial o totalmente des-O-acetilados en una o más posiciones de los anillos de los sacáridos, o pueden estar hiper-O-acetilados con relación a los sacáridos capsulares nativos.

15 Los sacáridos utilizados según la invención son preferiblemente más cortos que los sacáridos capsulares nativos que se observan en bacterias. Por tanto, los sacáridos están preferiblemente despolimerizados, produciéndose la despolimerización después de la purificación pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de la cadena de los sacáridos. Un procedimiento de despolimerización preferido implica el uso de peróxido de hidrógeno [9]. El peróxido de hidrógeno se añade a un sacárido (por ejemplo, para producir una concentración final de H₂O₂ del 1%), y la mezcla después se incuba (por ejemplo, a aproximadamente 55°C) hasta que se logra la reducción deseada en la longitud de la cadena. Otro procedimiento de despolimerización implica la hidrólisis ácida [10]. Otros procedimientos de despolimerización son conocidos por los expertos en la técnica. Los sacáridos utilizados para preparar los conjugados para su uso según la invención pueden obtenerse mediante cualquiera de estos procedimientos de despolimerización. La despolimerización puede utilizarse para proporcionar una longitud de cadena óptima para la inmunogenicidad y/o para reducir la longitud de la cadena para la manipulación física de los sacáridos.

20 25 Las proteínas vehículo típicas para su uso en los conjugados son toxinas o toxoides bacterianos, como la toxina de la difteria (o su mutante CRM₁₉₇) y la toxina del tétanos. Otras proteínas vehículo conocidas incluyen la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis*, péptidos sintéticos, proteínas de choque térmico, proteínas de pertussis, citoquinas, linfocinas, hormonas, factores del crecimiento, proteínas artificiales que comprenden epitopos de células T CD4⁺ humanos múltiples de diversos antígenos derivados de patógenos, la proteína D de *H. influenzae*, la proteína de la superficie PspA pneumocócica, proteínas de captación de hierro, la toxina A o B de *C. difficile*, etc. Sin embargo, según la invención, los conjugados meningocócicos incluyen una proteína vehículo de toxoide del tétanos. Se prefiere la conjugación covalente.

30 35 Es posible utilizar más de una proteína vehículo en las composiciones. Por tanto, pueden utilizarse diferentes proteínas vehículo para diferentes serogrupos, por ejemplo, los sacáridos del serogrupo A pueden estar conjugados con Tt, mientras que los sacáridos del serogrupo C pueden estar conjugados con Dt. También es posible utilizar más de una proteína vehículo para un antígeno de sacárido particular, por ejemplo, los sacáridos del serogrupo A pueden estar en dos grupos, algunos conjugados con Tt y otros conjugados con Dt. En general, sin embargo, se prefiere utilizar 40 la misma proteína vehículo para todos los sacáridos meningocócicos en la composición, y más preferiblemente para todos los sacáridos (es decir, incluyendo cualquier conjugado no meningocócico que pueda estar presente). Se prefiere que las composiciones de la invención no incluyan ninguna proteína vehículo de toxoide de la difteria.

45 Una única proteína vehículo puede portar más de un antígeno de sacárido [46]. Por ejemplo, una única proteína vehículo puede conjugarse con sacáridos de los serogrupos A y C. Para conseguir este objetivo, los sacáridos pueden mezclarse antes de la reacción de conjugación. Sin embargo, en general se prefiere tener conjugados separados para cada serogrupo. Los conjugados preferiblemente se mezclan para producir sustancialmente una proporción de 1:1:1:1 (medida como la masa del sacárido), por ejemplo, la masa del sacárido de cada serogrupo está dentro del ±10% entre sí. Una cantidad típica de antígeno meningocócico por serogrupo en una composición es entre 1 µg y 20 µg, por 50 ejemplo entre 2 y 10 µg por serogrupo, o aproximadamente 4 µg. Como alternativa a una proporción de 1:1:1:1 puede utilizarse una dosis doble de serogrupo A (2:1:1:1).

55 Los conjugados con una proporción de sacárido:proteína (en p/p) de entre 1:15 (es decir, un exceso de proteína) y 15:1 (es decir, un exceso de sacárido), preferiblemente entre 1:10 y 10:1, más preferiblemente entre 1:5 y 5:1, se prefieren. Se prefiere un exceso de proteína vehículo. Los conjugados con una proporción de sacárido:proteína de aproximadamente 1:12 o aproximadamente 1:6 o aproximadamente 1:3 se prefieren.

60 Los conjugados pueden utilizarse junto con la proteína vehículo libre [47]. Sin embargo, cuando una proteína vehículo dada está presente en forma libre y conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada preferiblemente no es más del 5% de la cantidad total de proteína vehículo en la composición como un todo, y más preferiblemente está presente en menos del 2% en peso. De forma similar, el sacárido conjugado preferiblemente no es más del 15% en peso de la cantidad total de sacárido.

65 Puede utilizarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier conector adecuado cuando sea necesario.

El sacárido, de forma típica, estará activado o funcionalizado antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos cianilantes como CDAP (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio

[48, 49, etc.]). Otras técnicas adecuadas emplean carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia bibliográfica 39.

- 5 Los enlaces a través del grupo conector pueden formarse utilizando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo los procedimientos descritos en las referencias bibliográficas 50 y 51. Un tipo de enlace implica la aminación reductora del polisacárido, el acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo conector de ácido adípico, y después el acoplamiento de la proteína al otro extremo del grupo conector de ácido adípico [37, 52, 53]. Otros conectores incluyen B-propionamido [54], nitrofeniletilamina [55], haluros de haloacilo [56], enlaces glicosídicos [57], ácido 6-aminocaproico [58], ADH [59], restos C₄ a C₁₂ [60], etc. Como alternativa a la utilización de un conector puede utilizarse un enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender la oxidación del polisacárido, seguido de una aminación reductora con la proteína como se describe, por ejemplo, en las referencias bibliográficas 61 y 62.
- 10 15 Se prefiere un proceso que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo reemplazando los grupos =O terminales por -NH₂), seguido de la derivatización con un diéster adípico (por ejemplo, diéster N-hidroxisuccinimídico del ácido adípico) y la reacción con la proteína vehículo.

En un procedimiento de conjugación preferido se hace reaccionar un sacárido con dihidrazida del ácido adípico. 20 Para el serogrupo A, en esta etapa también puede añadirse una carbodiimida. Después de un periodo de reacción se añade cianoborohidruro de sodio. Entonces puede prepararse el sacárido derivatizado, por ejemplo mediante ultrafiltración. El sacárido derivatizado entonces se mezcla con la proteína vehículo (por ejemplo, con un toxoide del tétanos) y se añade carbodiimida. Después de un periodo de reacción el conjugado puede recuperarse. Otros detalles de este procedimiento de conjugación pueden encontrarse en la referencia bibliográfica 10. Los conjugados que pueden 25 obtenerse mediante este procedimiento son conjugados preferidos para su uso según la invención, por ejemplo los conjugados que comprenden un vehículo de toxoide del tétanos y un conector de ácido adípico.

Los conjugados se preparan preferiblemente por separado y después se mezclan. Después del mezclado, la concentración de los conjugados mezclados puede ajustarse, por ejemplo con disolución salina tamponada con fosfato, 30 estéril y apirógena. Cada conjugado, antes del mezclado, contiene preferiblemente no más de 15 µg de vehículo.

El resultado de administrar los conjugados meningocócicos según la invención preferiblemente es que, para cada serogrupo administrado, el paciente genera una respuesta de anticuerpos bactericidas séricos (SBA), siendo el aumento 35 en la valoración de SBA (comparado con el paciente preinmunizado antes de recibir los conjugados meningocócicos mezclados) de al menos 4 veces y preferiblemente de al menos 8 veces. El ensayo de SBA es una correlación patrón para la protección meningocócica. En la referencia bibliográfica 63 se ofrecen más detalles acerca de las correlaciones serológicas para las vacunas meningocócicas.

Otros componentes antigénicos de las composiciones utilizadas según la invención

40 Además de los conjugados meningocócicos, las composiciones utilizadas según la invención pueden incluir opcionalmente 1, 2 o 3 de los siguientes antígenos adicionales:

1. Un sacárido capsular conjugado de *S. pneumoniae* [por ejemplo, el capítulo 23 de la referencia bibliográfica 31; 45 referencias bibliográficas 64-66]. Se prefiere incluir sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, las mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes se emplean ampliamente, al igual que las vacunas de conjugados con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [67]. Por ejemplo, PrevNarTM [68] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) estando cada sacárido conjugado individualmente con CRM197 mediante aminación reductora, con 2 µg de cada sacárido por dosis de 0,5 ml (4 µg del serotipo 6B), y estando los 50 conjugados adsorbidos sobre un adyuvante de fosfato de aluminio. Cuando se incluyen conjugados pneumocócicos en composiciones para su uso con la invención, la composición preferiblemente incluye al menos los serotipos 6B, 14, 19F y 23F.

2. Un sacárido capsular conjugado de *H. influenzae* B [por ejemplo, capítulo 14 de la referencia bibliográfica 31]. 55 La proteína vehículo para el conjugado puede ser un toxoide del tétanos, CRM197, Dt, o un complejo de la membrana externa de *N. meningitidis*. El resto sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo, poliribosilribitol fosfato (PRP) de longitud completa) pero se prefiere despolimerizar los polisacáridos capsulares para formar oligosacáridos (por ejemplo, PM de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 kDa). Un conjugado Hib preferido comprende un oligosacárido unido covalentemente a CRM197 o Tt a través de un conector de ácido adípico [69, 70]. La administración del antígeno Hib preferiblemente produce una concentración de anticuerpo anti-PRP de >0,15 µg/ml, y más preferiblemente >1 µg/ml. Cuando una composición incluye un antígeno de sacárido Hib, preferiblemente no incluye también un adyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio, entonces el antígeno Hib puede adsorberse sobre el adyuvante [71] o puede no adsorberse [27]. La prevención de la adsorción puede lograrse seleccionando el pH correcto durante el mezclado del antígeno/adyuvante, un adyuvante con un punto de carga cero apropiado, y un orden de mezclado apropiado para los diversos antígenos diferentes en una composición [72].

3. Un antígeno proteico del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* [por ejemplo, la referencia bibliográfica 73].

La composición puede comprender uno o más de estos otros antígenos.

Estos antígenos pueden o no adsorberse sobre una sal de aluminio.

5 Si los conjugados meningocócicos se van a administrar en una serie de dosis, entonces ninguna, alguna o todas las dosis pueden incluir estos antígenos adicionales.

10 Las composiciones que contienen los conjugados meningocócicos preferiblemente no incluyen el toxoide de la difteria. Preferiblemente no incluyen antígenos de pertussis. Preferiblemente no incluyen antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B. Preferiblemente no incluyen poliovirus. Una composición contiene preferiblemente no más de 50 µg del toxoide del tétanos por conjugado meningocólico, y más preferiblemente no más de 50 µg del toxoide del tétanos para todos los conjugados meningocócicos combinados.

La composición de vacuna

15 La composición utilizada según la invención incluirá, de forma típica, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estos vehículos incluyen cualquier vehículo que no induce en sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son, de forma típica, macromoléculas grandes que se metabolizan con lentitud, como proteínas, polisacáridos, polí(ácidos lácticos), polí(ácidos glicólicos), aminoácidos 20 poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa, trehalosa, lactosa, y agregados lipídicos (como gotas de aceite o líposomas). Estos vehículos son muy conocidos por los expertos en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes, como agua, disolución salina, glicerol, etc. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. La disolución salina fisiológica tamponada con fosfato, estéril y apirógena es un vehículo típico. En la referencia bibliográfica 74 está disponible un análisis exhaustivo de vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

25 Las composiciones utilizadas según la invención pueden incluir un antimicrobiano, en particular si están envasadas en un formato de múltiples dosis.

30 Las composiciones utilizadas según la invención pueden comprender un detergente, por ejemplo Tween (polisorbato), como Tween 80. Los detergentes están presentes en general a niveles bajos, por ejemplo <0,01%.

35 Las composiciones utilizadas según la invención pueden incluir sales sódicas (por ejemplo, cloruro de sodio y/o fosfato de sodio). Éstas pueden utilizarse para la tonicidad. Una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl es típica, por ejemplo aproximadamente 8,8 mg/ml. Una concentración de 1,2 mg/ml de fosfato de sodio es típica.

40 Las composiciones utilizadas según la invención en general incluirán un tampón, por ejemplo un tampón fosfato.

45 Las composiciones utilizadas según la invención pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa), por ejemplo a aproximadamente 15-30 mg/ml (por ejemplo, 25 mg/ml), en particular si se van a liofilizar o si incluyen un material que se ha reconstituido a partir de un material liofilizado. Sin embargo, las composiciones preferidas no están liofilizadas, es decir, todos los conjugados meningocócicos 50 están presentes en forma acuosa, desde la etapa del envasado a la etapa de la administración.

55 Las composiciones en general se administrarán directamente al paciente. La administración directa puede ser por inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o hacia el espacio intersticial de un tejido), o por vía rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra vía de administración mucosica. La administración intramuscular (por ejemplo, en el muslo o en el antebrazo) se prefiere. La inyección puede realizarse mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica) pero como alternativa 60 puede utilizarse una inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

65 Los conjugados meningocócicos de múltiples serogrupos se administran mezcladas en una única composición. La composición puede administrarse como una dosis única, o puede administrarse más de una vez en un programa de dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden utilizarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. Tras un programa de dosis primaria se puede realizar un programa de dosis de refuerzo de los conjugados meningocócicos. Puede determinarse de la forma habitual un tiempo adecuado entre las dosis de cebado (por ejemplo, entre 4-16 semanas) y entre el cebado y el refuerzo. Los conjugados pueden administrarse de modo conveniente al mismo tiempo que otras vacunas, por ejemplo, al mismo tiempo que una vacuna D-T-P, o al mismo tiempo que una vacuna de conjugado pneumocócico, o al mismo tiempo que una vacuna de la gripe, o al mismo tiempo que una vacuna MMR o MMRV. Estas vacunas en general se administrarán por separado pero durante la misma visita al doctor.

70 Las infecciones bacterianas pueden afectar a diversas áreas del cuerpo y, así, las composiciones pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, en disoluciones o en suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la disolución o la suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una composición liofilizada). La composición puede prepararse para la administración tópica, por ejemplo como un ungüento, una crema o un polvo. La composición puede prepararse para

la administración oral, por ejemplo como un comprimido o una cápsula, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para la administración pulmonar, por ejemplo como un inhalador, utilizando un polvo fino o un pulverizado. La composición puede prepararse como un suppositorio o un pesario. La composición puede prepararse para la administración nasal, aural u ocular, por ejemplo como un pulverizado, gotas, un gel o un polvo [por ejemplo, las referencias bibliográficas 75 y 76]. Sin embargo, en general los conjugados meningocócicos se formulan para la inyección intramuscular.

Las composiciones utilizadas según la invención pueden o no incluir un adyuvante de vacuna. Los adyuvantes que pueden utilizarse en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a:

10 A. *Composiciones que contienen minerales*

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales, como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la referencia bibliográfica 77] o mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, forma cristalina, amorfa, etc.), y siendo preferida la adsorción. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [78].

20 Los fosfatos de aluminio se prefieren particularmente, y un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar de PO_4/Al de entre 0,84 y 0,92, incluido a aproximadamente 0,6 mg de Al^{3+}/ml . Puede utilizarse una adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio, por ejemplo, entre 50 y 100 μg de Al^{3+} por conjugado por dosis. Cuando una composición incluye conjugados de múltiples especies bacterianas, entonces no es necesario que todos los conjugados se adsorban.

25 B. *Emulsiones de aceite*

30 Las composiciones de emulsiones de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, como MF59 [capítulo 10 de la referencia bibliográfica 77; véase también la referencia bibliográfica 79] (escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5%, y Span 85 al 0,5%, formulados en partículas submicrónicas utilizando un microfluidificador). También puede utilizarse adyuvante de Freund completo (CFA) y adyuvante de Freund incompleto (IFA).

35 C. *Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la referencia bibliográfica 77]*

35 Las formulaciones de saponina también pueden utilizarse como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glicósidos de esterol y glicósidos de triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia gama de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina se ha estudiado a fondo como adyuvante. La saponina también puede obtenerse en el mercado a partir de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (herba jabonera). Las formulaciones de adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, como QS21, así como formulaciones lipídicas, como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™.

45 Las composiciones de saponina se han purificado utilizando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado las fracciones purificadas específicas que emplean estas técnicas, incluyendo QS7, QS 17, QS 18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un procedimiento para producir QS21 se describe en la referencia bibliográfica 80. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, como un colesterol [81].

50 Las combinaciones de saponina y colesteroles pueden utilizarse para formar partículas exclusivas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la referencia bibliográfica 77]. Los ISCOM también incluyen de forma típica un fosfolípido, como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede utilizarse en los ISCOM. Preferiblemente, los ISCOM incluyen uno o más de QuILA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen más a fondo en las referencias bibliográficas 81-83. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar exentos de otro detergente [84].

55 En las referencias bibliográficas 85 y 86 puede encontrarse un análisis del desarrollo de adyuvantes basados en saponina.

60 D. *Virosomas y partículas de tipo vírico*

60 Los virosomas y las partículas de tipo vírico (“virus-like particles”, VLP) también pueden utilizarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen en general una o más proteínas de un virus opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. En general no son patógenas, no se replican y en general no contienen ninguna parte del genoma vírico nativo. Las proteínas víricas pueden producirse de modo recombinante o aislarlas de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para su uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (como HA o NA), virus de la hepatitis B (como proteínas del núcleo o de la cápsida), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la enfermedad del pie y la boca, retrovirus, virus Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, ARN-fagos, Q β -fagos (como proteínas de la envuelta), GA-fago, fr-fago, fago AP205, y

ES 2 343 855 T3

Ty (como la proteína p1 del retrotransposón de Ty). Las VLP se analizan más a fondo en las referencias bibliográficas 87-92. Los virosomas se analizan más a fondo, por ejemplo, en la referencia bibliográfica 93.

E. Derivados bacterianos o microbianos

5 Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos, como derivados no tóxicos del lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimulantes y toxinas de ADP-ribosilante y sus derivados detoxificados.

10 Los derivados no tóxicos de LPS incluyen el monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O- desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de “partícula pequeña” preferida del monofosforil lípido A 3-des-O-acetilado se describe en la referencia bibliográfica 94. Estas “partículas pequeñas” de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para poder esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 μm [94]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos del monofosforil lípido A, como derivados de aminoalquil glucosaminida fosfato, por ejemplo RC-529 [95, 96].

15 Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli*, como OM-174. El OM-174 se describe, por ejemplo, en las referencias bibliográficas 97 y 98.

20 Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no metilada unida mediante un enlace fosfato a una guanosina). También se ha demostrado que los ARN bicatenarios y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimulantes.

25 Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos, como modificaciones de fosforotioato, y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias bibliográficas 99, 100 y 101 describen posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, la sustitución de guanosina por 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza más a fondo en las referencias bibliográficas 102-107.

30 La secuencia CpG puede dirigirse a TLR9, como el motivo GTCGTT o TTCGTT [108]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunológica Th1, como CpG-A ODN, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, como CpG-B ODN. Los CpG-A y CpG-B ODN se analizan en las referencias bibliográficas 109-111. Preferiblemente, el CpG es un CpG-A ODN.

35 Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de tal forma que el extremo 5' es accesible para el reconocimiento de receptores. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG pueden estar unidas en sus extremos 3' para formar “inmunómeros”. Véase, por ejemplo, las referencias bibliográficas 108 y 112-114.

40 Las toxinas ADP-ribosilantes bacterianas y sus derivados detoxificados pueden utilizarse como adyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína se deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E. coli*, “LT”), cólera (“CT”) o pertussis (“PT”). El uso de toxinas ADP-ribosilantes detoxificadas como adyuvantes mucosicos se describe en la referencia bibliográfica 115, y como adyuvantes parenterales en la referencia bibliográfica 116. La toxina o el toxoide está preferiblemente en forma de una holotoxina, comprendiendo ambas subunidades A y B. Preferiblemente, la subunidad A contiene una mutación detoxificante; preferiblemente, la subunidad B no está mutada. Preferiblemente, el adyuvante es un mutante de LT detoxificado, como LT-K63, LT-R72, y LT-G192. El uso de toxinas ADP-ribosilantes y sus derivados detoxificados, en particular LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las referencias bibliográficas 117-124. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferiblemente en el alineamiento de las subunidades A y B de las toxinas ADP-ribosilantes indicadas en la referencia bibliográfica 125.

50 F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en esta invención incluyen citoquinas, como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [126], etc.) [127], interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos, y factor de necrosis tumoral.

55 G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

Los bioadhesivos y los mucoadhesivos también pueden utilizarse como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [128] o mucoadhesivos, como derivados reticulados de polí(ácido acrílico), polí(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosano y sus derivados también pueden utilizarse como adyuvantes en la invención [129].

H. Micropartículas

65 Las micropartículas también pueden utilizarse como adyuvantes en la invención. Las micropartículas (es decir, una partícula con un diámetro de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 150 μm , más preferiblemente con un diámetro de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 30 μm , y lo más preferiblemente con un diámetro de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 10 μm) formadas con materiales que son biodegradables y no tóxicos

ES 2 343 855 T3

(por ejemplo, un poli(α -hidroxiácido), un poli(ácido hidroxibutírico), un poliortoéster, un polianhídrido, una policalprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicólido) son preferidas, y opcionalmente están tratadas para que tengan una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, como CTAB).

5

I. Liposomas (capítulos 13 y 14 de la referencia bibliográfica 77)

Los ejemplos de formulaciones de liposomas adecuados para su uso como adyuvantes se describen en las referencias bibliográficas 130-132.

10

J. Formulaciones de polioxietilén éter y polioxietilén éster

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen polioxietilén éteres y polioxietilén ésteres [133]. Estas formulaciones incluyen además tensioactivos de polioxietilén sorbitán éster en combinación con un octoxinol [134], así como tensioactivos de polioxietilén alquil éter o éster en combinación con al menos otro tensioactivo no iónico, como octoxinol [135]. Los polioxietilén éteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauril éter (laureth- 9), polioxietilen-9-esteoril éter, polioxietilen-8-esteoril éter, polioxietilen-4-lauril éter, polioxietilen-35-lauril éter, y polioxietilen-23-lauril éter.

20

L. Péptidos de muramilo

Los ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilnormuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1,2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)etilamina MTP-PE.

25

K. Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en las referencias bibliográficas 136 y 137.

30

M. Compuestos de imidazoquinolona

Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen imiquamod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos más a fondo en las referencias 138 y 139.

35

N. Compuestos de tiosemicarbazona

Los ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, así como los procedimientos para formular, fabricar y seleccionar compuestos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en la referencia bibliográfica 140. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces para la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citoquinas, como TNF- α .

40

O. Compuestos de triptantrina

45

Los ejemplos de compuestos de triptantrina, así como los procedimientos para formular, fabricar y seleccionar compuestos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en la referencia bibliográfica 141. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces para la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citoquinas, como TNF- α .

50

La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvantes pueden utilizarse en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [142]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [143]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esterol) [144]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [145]; (6) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80TM al 0,4%, polímero en bloque plurónico L121 al 5%, y thr-MDP, microfluidificado en una emulsión submicrónica o agitado en vórtice para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor; (7) el sistema adyuvante RibiTM (Ribi Immunochem) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2%, y uno o más componentes de la pared de células bacterianas del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicrolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoxTM); (8) una o más sales minerales (como un sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (como 3dMPL); y (9) una o más sales minerales (como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulante (como una secuencia de nucleótidos que incluye un motivo CpG).

55

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se describen en el capítulo 7 de la referencia bibliográfica 77.

El uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio o de fosfato de aluminio se prefiere particularmente, y los conjugados en general se adsorben sobre estas sales [por ejemplo, los ejemplos 7 y 8 de la referencia bibliográfica 9; el ejemplo J de la referencia bibliográfica 10]. También es posible el mezclado con sales de aluminio sin adsorción [27, 72]. El fosfato de calcio es otro adyuvante preferido. Los conjugados pueden mezclarse con los adyuvantes (y opcionalmente adsorberse sobre éstos) por separado y después los conjugados pueden mezclarse entre sí, o los conjugados pueden mezclarse entre sí y después mezclarse con el adyuvante.

El pH de las composiciones utilizadas según la invención es preferiblemente entre 6 y 8, preferiblemente aproximadamente 7. Un pH estable puede mantenerse mediante el uso de un tampón. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere utilizar un tampón de histidina [146]. La composición puede ser estéril y/o apirógena. Las composiciones pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Las composiciones pueden incluir un conservante (por ejemplo, tiomersal, 2-fenoxietanol), o pueden estar exentas de conservantes. Las composiciones preferidas de la invención no incluyen ningún material mercúrico, por ejemplo, están exentas de tiomersal.

Para evitar interferencias entre antígenos, en particular entre antígenos conjugados, es posible incluir un polímero polianiónico, como poli(ácido L-glutámico) [147].

Las composiciones pueden presentarse en viales, o pueden presentarse en jeringas ya llenas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una dosis única del compuesto, mientras que un vial puede incluir una dosis única o múltiples dosis. Las composiciones inyectables normalmente serán disoluciones o suspensiones líquidas. Como alternativa, pueden presentarse en forma sólida (por ejemplo, liofilizadas) para su disolución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

Las composiciones pueden envasarse en una forma de dosis unitaria o en una forma de dosis múltiples. Para las formas de dosis múltiples, los viales se prefieren frente a las jeringas prerrellenas. Los volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse de la forma habitual, pero una dosis típica para seres humanos de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

Cuando una composición se va a preparar de modo improvisado antes de su uso (por ejemplo, cuando una composición se presenta en forma liofilizada) y se presenta como un kit, el kit puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa ya rellena y un vial, utilizándose los contenidos de la jeringa para reactivar los contenidos de los viales antes de la inyección. Para composiciones que incluyen un sacárido capsular del serogrupo A, el sacárido del serogrupo A puede estar liofilizado, mientras que el sacárido o sacáridos de otro u otros serogrupos pueden estar presentes en forma líquida.

Las composiciones comprenderán una cantidad inmunológicamente eficaz de los conjugados meningocócicos, así como cualquier otro componente según sea necesario. Una "cantidad inmunológicamente eficaz" significa que la administración de esa cantidad a un individuo, tanto en una dosis única como parte de una serie, provoca una respuesta inmunológica antimeningocócica protectora en pacientes. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y de la condición física del individuo que se va a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (por ejemplo, primates no humanos, primates, etc.), la capacidad del sistema inmunológico del individuo para sintetizar anticuerpos, los grados de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del doctor encargado de la situación médica, y otros factores pertinentes. Se espera que la cantidad estará en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos habituales, y una cantidad típica de cada antígeno meningocócico por dosis es de entre 1 μ g y 20 μ g por serogrupo (medidos en términos del sacárido), por ejemplo entre 2 y 10 μ g por serogrupo. Una dosis de aproximadamente 4 μ g por serogrupo se prefiere (es decir, un total de 16 μ g en una mezcla tetravalente).

La cantidad total de proteína vehículo en una composición preferiblemente no es mayor que 100 μ g/dosis, por ejemplo, es \leq 90 μ g/dosis, \leq 80 μ g/dosis, \leq 70 μ g/dosis, \leq 60 μ g/dosis, \leq 50 μ g/dosis, etc. La cantidad total de proteína vehículo en una composición será, en general, al menos 10 μ g/dosis.

Generalidades

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

El término "aproximadamente" con relación a un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

El término "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, el término "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

Modos para realizar la invención

No hay supresión por el vehículo empleando una mezcla de conjugados A/C/W135/Y tetravalente

- 5 Pueden prepararse mezclas de conjugados meningocócicos para los serogrupos A+C, C+W+Y o A+C+W+Y como se describe en las referencias bibliográficas 9 y 10. Si se desea, éstas pueden mezclarse con adyuvantes de hidróxido de aluminio o de fosfato de aluminio, como también se describe en las referencias bibliográficas 9 y 10. Estas vacunas se preparan utilizando una proteína vehículo de toxoide del tétanos (Tt) [147], unida covalentemente a los sacáridos.
- 10 Los pacientes que han recibido una vacunación pediátrica D-T-P (D-T-Pa o D-T-Pw), incluyendo los que han recibido vacunas que contienen D-T-P y otros antígenos (por ejemplo, D-T-P-Hib tetravalente, D-T-P-HBsAg tetravalente, D-T-P-Hib-HBsAg pentavalente, D-T-P-Hib-HBsAg-IPV hexavalente, etc.) se selecciona para recibir la mezcla de conjugados que tiene un vehículo Tt.
- 15 Se selecciona un grupo control de pacientes para recibir una de las dos mezclas de conjugados. Los pacientes control no han recibido previamente el toxoide del tétanos, tanto como un antígeno separado como en forma de una proteína vehículo en un conjugado.
- 20 Se evalúa la capacidad de los conjugados tetravalentes para provocar una respuesta inmunológica en los pacientes. Se indica una supresión por el vehículo si los grupos de ensayo muestran respuestas inmunológicas antimeningocócicas significativamente menores que los pacientes control y, en particular, si los conjugados no pueden provocar una respuesta SBA útil en los pacientes.
- 25 En el ensayo clínico V59P2, realizado en Finlandia y Alemania con 620 sujetos de 12-16 meses de edad se ensayaron cinco formulaciones. Las vacunas utilizan CRM197 como vehículo y un adyuvante de fosfato de aluminio [10]. Las dosis de cada sacárido del serogrupo, expresadas como μg de masa del sacárido por dosis de 0,5 ml, fueron las siguientes:

30	Grupo	MenA	MenC	MenW135	MenY
35	1	10	10	10	10
40	2	0	10	10	10
	3	10	5	5	5
	4	5	5	5	5
	5	2,5	2,5	2,5	2,5

Los sujetos recibieron una inyección en el tiempo cero, y 25% de los sujetos entonces recibieron una segunda dosis de la vacuna 4 semanas después.

- 45 El suero de los pacientes se recogió 1 mes después de la administración de la vacuna y se ensayó en un ensayo SBA contra *N. meningitidis* de cada serogrupo, utilizando el complemento humano. Se evaluó el aumento en la valoración de SBA con relación a los sueros a tiempo cero, siendo el criterio $\geq 1:4$ y $\geq 1:8$. También se midieron las valoraciones anticápsula (GMT) para cada serogrupo. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.
- 50 Por tanto, las vacunas trivalentes y tetravalentes eran ambas inmunogénicas en niños pequeños. Los conjugados son inmunogénicos a dosis de sacárido tan bajas como 2,5 μg por conjugado. Las respuestas inmunológicas pueden reforzarse, con un gran aumento en la valoración de SBA después de la segunda dosis. No hubo evidencias de supresión por el vehículo en este ensayo.
- 55 Se entenderá que la invención se ha descrito anteriormente sólo como ejemplo y que pueden realizarse modificaciones y permanecer dentro del alcance de la invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas.

ES 2 343 855 T3

TABLA 1

Resultados del ensayo V59P2

5	Grupo	A	C	W1315	Y
	GMT (1 mes después de 1 dosis)				
10	1	3,9	6,4	7,1	8,9
15	2	2	6,1	8,3	8,5
20	3	5,7	5,2	6,9	12
25	4	3,8	4,5	7,0	9,6
30	5	3,9	5,3	7,0	12
35	GMT (1 mes después de 2 dosis)				
40	1	27	89	22	37
45	2	2	80	20	57
50	3	29	76	28	58
55	4	14	47	20	35
60	5	17	71	23	52
65	% de pacientes con SBA $\geq 1:4$ (1 mes después de 1 dosis)				
1	33	56	57	58	
2	0	57	60	61	
3	55	49	53	70	
4	37	42	54	64	
5	40	51	57	67	
	% de pacientes con SBA $\geq 1:4$ (1 mes después de 2 dosis)				
1	100	100	96	96	
2	0	100	73	92	
3	91	96	95	95	
4	84	96	88	96	
5	80	100	80	92	
	% de pacientes con SBA $\geq 1:8$ (1 mes después de 1 dosis)				
1	25	44	46	48	
2	0	40	50	49	
3	39	34	45	64	
4	23	30	44	51	
5	26	35	40	60	
	% de pacientes con SBA $\geq 1:8$ (1 mes después de 2 dosis)				
1	92	100	85	93	
2	0	100	64	92	
3	87	96	95	82	
4	60	92	77	92	
5	72	92	72	88	

Referencias bibliográficas (cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia)

- [1] **Armand** *et al.* (1982), *J. Biol. Strand.*, 10:335-339.
- 5 [2] **Cadoz** *et al.* (1985), *Vaccine*, 3:340-342.
- [3] *MMWR* (1997), 46(RR-5), 1-10.
- 10 [4] **Baklaic** *et al.* (1983), *Infect. Immun.*, 42:599-604.
- [5] **Jones** (2001), *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, 2:47-49.
- 15 [6] **Costantino** *et al.* (1992), *Vaccine*, 10:691-698.
- [7] **Lieberman** *et al.* (1996), *JAMA*, 275:1499-1503.
- [8] documento WO2005/000345.
- 20 [9] documento WO02/058737.
- [10] documento WO03/007985.
- [11] **Rennels** *et al.* (2002), *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 21:978-979.
- 25 [12] documento WO2004/013400.
- [13] **Campbell** *et al.* (2002), *J. Infect. Dis.*, 186:1848-1851.
- 30 [14] **Herzenberg** *et al.* (1980), *Nature*, 285:664-667.
- [15] **Schutze** *et al.* (1985), *J. Immunol.*, 135:2319-2322.
- [16] **Dagan** *et al.* (1998), *Infect. Immun.*, 66:2093-2098.
- 35 [17] **Barington** *et al.* (1994), *Infect. Immun.*, 62:9-14.
- [18] **Di John** *et al.* (1989), *Lancet*, 2(8677):1415-1418.
- 40 [19] **Granoff** *et al.* (1993), *Vaccine*, supl. 1: S46-S51.
- [20] **Granoff** *et al.* (1994), *JAMA*, 272:1116-1121.
- [21] **Barington** *et al.* (1993), *Infect. Immun.*, 61:432-438.
- 45 [22] patente australiana 748716 (concedida desde el documento WO98/51339).
- [23] **Olander** *et al.* (2001), *Vaccine*, 20:336-341.
- 50 [24] **Burrage** *et al.* (2002), *Infect. Immun.*, 70:4946-4954.
- [25] **Peeters** *et al.* (1999), *Infect. Immun.*, 59:3504-3510.
- [26] **Hoppenbrouwers** *et al.* (1999), *Vaccine*, 17:2588-2598.
- 55 [27] documento WO02/00249.
- [28] documento WO00/56360.
- [29] **Reddin** *et al.* (2001), *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 31:153-162.
- 60 [30] **Podda** *et al.* (1991), *Vaccine*, 9:741-745.
- [31] *Vaccines* (eds. Plotkin y Orenstein), 4^a edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- 65 [32] **Ramsay** *et al.* (2001), *Lancet*, 357(9251):195-196.
- [33] **Lindberg** (1999), *Vaccine*, 17, supl. 2:S28-S36.

- [34] **Buttery y Moxon** (2000), *J. R. Coll. Physicians. Lond.*, 34:163-168.
- [35] **Ahmad y Chapnick** (1999), *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 13:113-133, vii.
- 5 [36] **Goldblatt** (1998), *J. Med. Microbiol.*, 47:563-567.
- [37] patente europea 0477508.
- 10 [38] patente de EEUU 5.306.492.
- [39] documento WO98/42721.
- [40] **Dick** *et al.*, en *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*), Karger, Basilea, 1989, 10:48-114.
- 15 [41] Hermanson Bioconjugate Techniques, *Academic Press*, San Diego (1996), ISBN: 0123423368.
- [42] documento WO03/080678.
- 20 [43] **Glode** *et al.* (1979), *J. Infect. Dis.*, 139:52-56.
- [44] documento WO94/05325; patente de EEUU 5.425.946.
- [45] solicitud de patente del Reino Unido 0323103.2.
- 25 [46] documento WO99/42130.
- [47] documento WO96/40242.
- [48] **Lees** *et al.* (1996), *Vaccine*, 14:190-198.
- 30 [49] documento WO95/08348.
- [50] patente de EEUU 4.882.317.
- [51] patente de EEUU 4.695.624.
- [52] **Porro** *et al.* (1985), *Mol. Immunol.*, 22:907-919.
- 40 [53] documento EP-A-0208375.
- [54] documento WO00/10599.
- [55] **Gever** *et al.*, *Med. Microbiol. Immunol.*, 165:171-288 (1979).
- 45 [56] patente de EEUU 4.057.685.
- [57] patentes de EEUU 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [58] patente de EEUU 4.459.286.
- 50 [59] patente de EEUU 4.965.338.
- [60] patente de EEUU 4.663.160.
- [61] patente de EEUU 4.761.283.
- [62] patente de EEUU 4.356.170.
- 60 [63] **Balmer y Borrow** (2004), *Expert Rev. Vaccines*, 3:77-87.
- [64] **Watson** (2000), *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 19:331-332.
- [65] **Rubin** (2000), *Pediatr. Clin. North Am.*, 47:269-285, v.
- 65 [66] **Jedrzejas** (2001), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65:187-207.
- [67] **Zielen** *et al.* (2000), *Infect. Immun.*, 68:1435-1440.

- [68] **Darkes y Plosker** (2002), *Paediatr. Drugs*, 4:609-630.
- [69] **Kanra** *et al.* (1999), *The Turkish Journal of Paediatrics*, 42:421-427.
- 5 [70] **Ravenscroft** *et al.* (2000), *Dev. Biol.* (Basilea), 103: 35-47.
- [71] documento WO97/00697.
- 10 [72] documento WO96/37222; patente de EEUU 6.333.036.
- [73] documento WO2004/032958.
- [74] **Gennaro** (2000), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., ISBN: 0683306472.
- 15 [75] **Almeida y Alpar** (1996), *J. Drug Targeting*, 3:455-467.
- [76] **Agarwal y Mishra** (1999), *Indian J. Exp. Biol.*, 37:6-16.
- 20 [77] Vaccine Design (1995), eds. Powell y Newman, ISBN: 030644867X. Plenum.
- [78] documento WO00/23105.
- [79] documento WO90/14837.
- 25 [80] patente de EEUU 5.057.540.
- [81] documento WO96/33739.
- [82] documento EP-A-0109942.
- 30 [83] documento WO96/11711.
- [84] documento WO00/07621.
- [85] **Barr** *et al.* (1998), *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32:247-271.
- [86] **Sjolanderet** *et al.* (1998), *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32:321-338.
- 35 [87] **Niikura** *et al.* (2002), *Virology*, 293:273-280.
- [88] **Lenz** *et al.* (2001), *J. Immunol.*, 166:5346-5355.
- [89] **Pinto** *et al.* (2003), *J. Infect. Dis.*, 188:327-338.
- 40 [90] **Gerber** *et al.* (2001), *Virol.*, 75:4752-4760.
- [91] documento WO03/024480.
- [92] documento WO03/024481.
- 45 [93] **Gluck** *et al.* (2002), *Vaccine*, 20:B10-B16.
- [94] documento EP-A-0689454.
- 50 [95] **Johnson** *et al.* (1999), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9:2273-2278.
- [96] **Evans** *et al.* (2003), *Expert Rev. Vaccines*, 2:219-229.
- 55 [97] **Meraldi** *et al.* (2003), *Vaccine*, 21:2485-2491.
- [98] **Pajak** *et al.* (2003), *Vaccine*, 21:836-842.
- 60 [99] **Kandimalla** *et al.* (2003), *Nucleic Acids Research*, 31:2393-2400.
- [100] documento WO02/26757.
- 65 [101] documento WO99/62923.

- [102] **Krieg** (2003), *Nature Medicine*, 9:831-835.
- [103] **McCluskie** *et al.* (2002), *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 32:179-185.
- 5 [104] documento WO98/40100.
- [105] patente de EEUU 6.207.646.
- 10 [106] patente de EEUU 6.239.116.
- [107] patente de EEUU 6.429.199.
- [108] **Kandimalla** *et al.* (2003), *Biochemical Society Transactions*, 31 (parte 3):654-658.
- 15 [109] **Blackwell** *et al.* (2003), *J. Immunol.*, 170:4061-4068.
- [110] **Krieg** (2002), *Trends Immunol.*, 23:64-65.
- 20 [111] documento WO01/95935.
- [112] **Kandimalla** *et al.* (2003), *BBRC*, 306:948-953.
- [113] **Bhagat** *et al.* (2003), *BBRC*, 300:853-861.
- 25 [114] documento WO03/035836.
- [115] documento WO95/17211.
- 30 [116] documento WO98/42375.
- [117] **Beignon** *et al.* (2002), *Infect. Immun.*, 70:3012-3019.
- [118] **Pizza** *et al.* (2001), *Vaccine*, 19:2534-2541.
- 35 [119] **Pizza** *et al.* (2000), *Int. J. Med. Microbiol.*, 290:455-461.
- [120] **Scharton-Kersten** *et al.* (2000), *Infect. Immun.*, 68:5306-5313.
- 40 [121] **Ryan** *et al.* (1999), *Infect. Immun.*, 67:6270-6280.
- [122] **Partidos** *et al.* (1999), *Immunol. Lett.*, 67:209-216.
- 45 [123] **Peppoloni** *et al.* (2003), *Expert Rev. Vaccines*, 2:285-293.
- [124] **Pine** *et al.* (2002), *J. Control Release*, 85:263-270.
- 50 [125] **Domenighini** *et al.* (1995), *Mol. Microbiol.*, 15:1165-1167.
- [126] documento WO99/40936.
- [127] documento WO99/44636.
- 55 [128] **Singh** *et al.* (2001), *J. Cont. Release*, 70:267-276.
- [129] documento WO99/27960.
- [130] patente de EEUU 6.090.406.
- 60 [131] patente de EEUU 5.916.588.
- [132] documento EP-A-0626169.
- [133] documento WO99/52549.
- 65 [134] documento WO01/21207.
- [135] documento WO01/21152.

ES 2 343 855 T3

[136] **Andrianov et al. (1998)**, *Biomaterials*, 19:109-115.

[137] **Payne et al. (1998)**, *Adv. Drug Delivery Review*, 31:185-196.

5 [138] **Stanley (2002)**, *Clin. Exp. Dermatol.*, 27:571-577.

[139] **Jones (2003)**, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 4:214-218.

10 [140] documento WO04/60308.

[141] documento WO04/64759.

[142] documento WO99/11241.

15 [143] documento WO94/00153.

[144] documento WO98/57659.

20 [145] solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.

[146] documento WO03/009869.

[147] documento WO2004/110480.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende al menos dos de: (a) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos; (b) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos; (c) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo W135 de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos; y (d) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos, para su uso en un procedimiento para inmunizar a un paciente humano contra una enfermedad provocada por *Neisseria meningitidis*, que comprende la etapa de administrar al paciente humano la composición, habiendo sido el paciente preinmunizado con (a) un toxoide del tétanos y/o (b) un conjugado de (i) un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos.
2. El uso de al menos dos de: (a) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos; (b) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos; (c) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo W135 de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos; y (d) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos, para la fabricación de un medicamento para inmunizar a un paciente humano contra una enfermedad provocada por *Neisseria meningitidis*, habiendo sido el paciente preinmunizado con (a) un toxoide del tétanos y/o (b) un conjugado de (i) un sacárido capsular de un organismo distinto de *N. meningitidis*, y (ii) un toxoide del tétanos.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende los cuatro de (a), (b), (c) y (d).
4. El uso de la reivindicación 2, en el que el uso es de los cuatro de (a), (b), (c) y (d).
5. La composición de la reivindicación 3 o el uso de la reivindicación 4, en los que los conjugados se mezclan para producir una proporción 1:1:1:1 (medida como masa del sacárido).
6. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que cada antígeno meningocócico por dosis es entre 2 y 10 µg por serogrupo (medido en términos del sacárido).
7. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que el paciente ha sido preinmunizado con una vacuna que comprende un toxoide del tétanos.
8. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que el paciente ha sido preinmunizado con una vacuna que comprende un conjugado Hib.
9. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que el paciente ha sido preinmunizado con una vacuna que comprende al menos un conjugado pneumocócico.
10. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que el paciente ha sido preinmunizado al menos seis meses antes del procedimiento o uso.
11. La composición o el uso de la reivindicación 10, en los que el paciente ha sido preinmunizado al menos 8 años antes del procedimiento o uso.
12. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la preinmunización tuvo lugar dentro del año del nacimiento del paciente.
13. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que los sacáridos en los conjugados meningocócicos (a) a (d) han sido despolimerizados de forma que son más cortos que los sacáridos capsulares nativos que se observan en meningococos.
14. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que los conjugados meningocócicos comprenden un vehículo de toxoide del tétanos y un conector de ácido adípico.
15. La composición o el uso de la reivindicación 14, que comprende no más de 60 µg de vehículo de toxoide del tétanos.
16. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la composición o el medicamento comprende además un sacárido capsular conjugado de *Streptococcus pneumoniae*.
17. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la composición o el medicamento comprende además un sacárido capsular conjugado de *Haemophilus influenzae* de tipo B.
18. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la composición o el medicamento comprende además un antígeno proteico del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

ES 2 343 855 T3

19. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la composición o el medicamento incluye un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o un adyuvante de fosfato de aluminio.

5 20. La composición o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la enfermedad provocada por *Neisseria meningitidis* es la meningitis meningocócica.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65