



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 128**

51 Int. Cl.:
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03727880 .1**
96 Fecha de presentación : **14.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1506008**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

54 Título: **Vacunas mucosales con adyuvante quitosán y/o antígenos meningocócicos.**

30 Prioridad: **14.05.2002 US 380675 P**
30.01.2003 GB 0302218

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.11.2009

73 Titular/es: **Universiteit Leiden**
Leiden/Amsterdam Center for Drug Research
Einsteinweg 55
2333 CC Leiden, NL
Novartis Vaccines and Diagnostics S.R.L.

72 Inventor/es: **Del Giudice, Giuseppe;**
Baudner, Barbara y
O'Hagan Derek Thomas

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 328 128 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).

ES 2 328 128 T3

DESCRIPCIÓN

Vacunas mucosales con adyuvante quitosán y/o antígenos meningocócicos.

5 **Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo de las vacunas, particularmente contra infección y enfermedad meningocócica.

10 **Técnica anterior**

15 *Neisseria meningitidis* es un patógeno humano Gram-negativo [por ejemplo, véase el capítulo 28 de la ref. 1] que provoca meningitis bacteriana. Está estrechamente relacionada con *N. gonorrhoeae*, aunque una característica que claramente la diferencia de meningococo es la presencia de una cápsula de polisacárido que está presente en todos los meningococos patógenos.

20 Basándose en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado doce serogrupos de *N. meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W 135, X, Y y Z). El grupo A es la causa más común de de enfermedad epidémica en África subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la gran mayoría de casos en los países desarrollados, siendo los casos restantes causados por los serogrupos W135 e Y.

Además de usarse para la clasificación, el polisacárido capsular se ha usado para vacunación.

25 Se ha conocido desde hace muchos años una vacuna tetravalente inyectable de polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, Y y W135 [2, 3] y se ha autorizado para uso humano. Aunque es eficaz en adolescentes y adultos, induce una escasa respuesta inmune y una corta duración de protección y no se puede usar en niños [por ejemplo, 4]. Los polisacáridos en esta vacuna no están conjugados y están presentes a una relación de peso de 1:1:1:1 [5]. MENCEVAX ACWY™ y MENOMUNE™ ambos contienen 50 µg de cada polisacárido purificado reconstituido a partir de sus formas liofilizadas.

30 Los oligosacáridos del serogrupo C conjugados se han aprobado para uso humano [por ejemplo, Menjugate™; ref. 6]. Sin embargo, permanece una necesidad de mejoras en las vacunas conjugadas contra los serogrupos A, W135 e Y, y su fabricación. Esta necesidad se dirige a los productos, procedimientos y usos descritos en la referencia 8, pero permanece la necesidad de modificaciones y mejoras adicionales, particularmente en relación con la administración y formulación.

35 **Descripción de la invención**

40 La invención proporciona una composición inmunogénica, que comprende (a) un antígeno de sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*, y (b) un adyuvante de quitosán. La composición preferiblemente comprende (c) uno o más antígenos adicionales y/o (d) uno o más adyuvantes adicionales.

45 La invención también proporciona una composición inmunogénica para la administración mucosal que comprende sacáridos capsulares del serogrupo C de *N. meningitidis* y sacáridos capsulares de 1 o más serogrupos A, twi 35 y de *N. meningitidis*

50 Se prefiere que los sacáridos capsulares en las composiciones de la invención están conjugados a una proteína(s) vehículo(s) y/o son oligosacáridos. Se prefieren particularmente los antígenos de oligosacáridos conjugados (Figura 1).

Antígeno sacárido capsular de meningococo de serogrupo C

55 El sacárido capsular de serogrupo C de *N. meningitidis* se ha usado ampliamente como un antígeno. El ingrediente activo de Menjugate™, por ejemplo, es un fragmento de oligosacárido del polisacárido capsular, conjugado a la proteína vehículo CRM₁₉₇.

60 Cuando una composición de la invención incluye un antígeno de sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*, se prefiere usar un fragmento de oligosacárido del polisacárido capsular y/o para conjugarse el antígeno de sacárido a una proteína vehículo. Los antígenos de sacárido particularmente preferidos de MenC se describen en las referencias 6 y 9.

Los detalles adicionales de la producción y conjugación de oligosacáridos se proporcionan más adelante.

65 *Mezclas de Sacáridos*

Las composiciones de la invención pueden comprender sacáridos capsulares de serogrupo C de *N. meningitidis* y los sacáridos capsulares de 1 o más serogrupos A, W135 e Y de *N. meningitidis*.

ES 2 328 128 T3

Se prefieren las mezclas de sacáridos de más de un serogrupo de *N. meningitidis* por ejemplo, las composiciones que comprenden los sacáridos de los serogrupos A+C, C+W135, C+Y, A+C+W135, A+C+Y, C+W135+Y, A+C+W135+Y, etc. Se prefiere que la eficacia protectora de los antígenos de sacáridos individuales no se elimine mediante la combinación de los mismos, aunque se pueda reducir la inmunogenicidad real (por ejemplo, titulaciones de ELISA).

Las composiciones preferidas comprenden sacáridos de los serogrupos C e Y. Otras composiciones preferidas comprenden los sacáridos de los serogrupos C, W135 e Y.

Cuando una mezcla comprende los sacáridos capsulares de ambos serogrupos A y C, la relación (p/p) del sacárido MenA:sacárido MenC puede ser mayor que 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor).

Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares del serogrupo Y y los serogrupos C y/o W135, la relación (p/p) del sacárido MenY: sacárido MenW135 puede ser mayor que 1 (por ejemplo, 2:1,3:1,4:1,5:1,10:1 o mayor) y/o que la relación (p/p) del sacárido MenY: sacárido MenC puede ser menos que 1 (por ejemplo, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, o inferior).

Las relaciones preferidas (p/p) para los sacáridos de los serogrupos A:C: W135:Y son: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2:1.

Purificación de polisacárido capsulares

Los polisacáridos capsulares meningocócicos se preparan típicamente mediante un procedimiento que comprende las etapas de precipitación de polisacárido (por ejemplo, usando un detergente catiónico), fraccionamiento por etanol, extracción por fenol en frío (para eliminar proteína) y ultracentrifugación (para eliminar LPS) [por ejemplo, ref. 10].

Sin embargo un procedimiento más preferido [8], implica la precipitación del polisacárido seguido de la solubilización del polisacárido precipitado usando un alcohol inferior. La precipitación se puede lograr usando un detergente catiónico tal como sales de tetrabutylammonio y de cetiltrimetilammonio (por ejemplo, las sales de bromo), o bromuro de hexadimetina y las sales de miristiltrimetilammonio.

Se prefiere particularmente bromuro de bromuro de cetiltrimetilammonio ("CTAB") [11]. La solubilización del material precipitado se puede llevar a cabo usando un alcohol inferior tal como metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metilpropan-1-ol, 2-metilpropan-2-ol, dioles, etc., but etanol es particularmente adecuado para la solubilización de complejos de CTAB- polisacárido. Se añade preferiblemente etanol al polisacárido precipitado para proporcionar una concentración de etanol final (basándose en el contenido total de etanol y agua) de entre 50% y 95%.

Después de la solubilización de nuevo, el polisacárido se puede además tratar para eliminar los contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en las que incluso la contaminación secundaria no es aceptable (por ejemplo, para la producción de vacuna humana). Esto típicamente implicará una o más etapas de filtración por ejemplo, filtración en profundidad, filtración a través de carbono activo, filtración por tamaño y/o ultrafiltración.

Una vez que se ha filtrado para eliminar los contaminantes, el polisacárido se puede precipitar para tratamiento y/o procesamiento adicional. Esto se puede lograr de manera conveniente mediante intercambio de cationes (por ejemplo, mediante la adición de sales de calcio o de sodio).

El polisacárido se puede modificar químicamente. Por ejemplo, se puede modificar para reemplazar uno o más grupos hidroxilo grupos con grupos de bloqueo. Esto es particularmente útil para el serogrupo A [12].

Oligosacáridos

Los sacáridos capsulares en general estarán en la forma de oligosacáridos. Éstos se forman de manera conveniente mediante fragmentación de polisacárido capsular purificada (por ejemplo, mediante hidrólisis, en medio ácido débil, o mediante calentamiento), a la que normalmente seguirá la purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

La fragmentación de polisacáridos se realiza preferiblemente para proporcionar un grado medio final de polimerización (DP) en el oligosacárido de menos de 30 (por ejemplo, entre 10 y 20, preferiblemente alrededor de 10 para el serogrupo A; entre 15 y 25 para los serogrupos W135 e Y, preferiblemente alrededor de 15-20; entre 12 y 22 para el serogrupo C; etc.). DP se puede medir de manera conveniente mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante ensayos colorimétricos [13].

Si la hidrólisis se realiza, el hidrolizado en general se ajustará en tamaño con el fin de eliminar los oligosacáridos de longitud corta. Esto se puede lograr de varias formas, tal como la ultrafiltración seguida de cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización de menos de o igual a aproximadamente 6 se eliminan preferiblemente para el serogrupo A, y los de menos de alrededor de 4 se eliminan preferiblemente para los serogrupos W135 e Y.

Conjugación covalente

Los sacáridos capsulares en las composiciones de la invención estarán usualmente conjugados a una(s) proteína(s) vehículo.

En general, la conjugación potencia la inmunogenicidad de los sacáridos a medida que se convierten los antígenos T-independientes en antígenos T-dependientes, permitiendo de este modo el cebado la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas [por ejemplo, ref. 14] y también es una técnica bien conocida [por ejemplo, como se revisa en las refs. 15 a 23, etc.].

Las proteínas vehículo preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoides de difteria o de tétanos. Se prefiere particularmente el toxoide de difteria CRM197 [24, 25, 26]. Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [27], péptidos sintéticos [28, 29], proteínas de choque térmico [30, 31], proteínas de tos ferina [32, 33], citoquinas [34], linfoquinas [34], hormonas [34], factores de crecimiento [34], proteínas artificiales que comprenden epítopes de células CD4+ T múltiples humanas de diversos antígenos derivados de patógenos [35], proteína D de *H. influenzae* [36], toxina A o B de *C. difficile* [37], etc.

Dentro de una composición de la invención, es posible usar más de una proteína vehículo. De este modo las proteínas vehículo se podrían usar para los diferentes serogrupos por ejemplo, los sacáridos del serogrupo A se podrían conjugar a CRM₁₉₇ mientras que los sacáridos del serogrupo C se podrían conjugar a toxoide de tétanos. También es posible usar más de una proteína vehículo para un antígeno de sacárido particular por ejemplo, sacáridos del serogrupo A podrían estar en dos grupos, con algún conjugado a CRM₁₉₇ y otros conjugados a toxoide de tétanos. Sin embargo en general se prefiere usar la misma proteína vehículo para todos los sacáridos.

Una única proteína vehículo podría ser más de un antígeno de sacárido [38]. Por ejemplo, una única proteína vehículo podría tener conjugada a ella sacáridos de los serogrupos A y C.

Se prefieren los conjugados con una relación de sacárido:proteína (p/p) de entre 0,5:1 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido), y se prefieren más aquellos con entre 1:1,25 y 1:2,5.

Los conjugados se pueden usar junto con la proteína vehículo libre [39].

Se puede usar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier engarce adecuado cuando sea necesario.

Típicamente el sacárido se activará o se funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (por ejemplo, 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [40, 41, etc.]). Otras técnicas adecuadas usan carbodímidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 21).

Se pueden realizar enlaces mediante un grupo de engarce usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 42 y 43. Un tipo de enlace implica la aminación reductora del polisacárido, acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo de engarce de ácido adípico, y después acoplamiento de una proteína al otro extremo del grupo de engarce del ácido adípico [19, 44, 45]. Otros engarces incluyen engarces de B-propionamido [46], nitrofenil-etilamina [47], haluros de haloacilol [48], glicosídicos [49], ácido 6-aminocaproico [50], ADH [51], restos C₄ a C₁₂ [52] etc. Como una alternativa al uso de engarce, se puede usar un engarce directo. Los engarces directos a la proteína pueden comprender la oxidación del polisacárido seguido de la aminación reductora con la proteína, como se describe, por ejemplo, en las referencias 53 y 54.

Se prefiere un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, mediante el reemplazo de los grupos =O terminales con -NH₂) seguido de la derivación de con un diéster adípico (por ejemplo, N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico) y reacción con proteína vehículo.

Después de la conjugación, se pueden separar los sacáridos libres y conjugados. Existen muchos procedimientos adecuados, incluyendo cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración etc. [véanse también las refs. 55 y 56, etc.].

Cuando la composición de la invención incluye un oligosacárido conjugado, se prefiere que la preparación del oligosacárido

Preceda a la conjugación.

Preparación de composiciones de la invención

Cuando las composiciones de la invención incluyen más de un tipo de sacárido capsular, preferiblemente se preparan de manera separada (incluyendo cualquier fragmentación, conjugación, etc.) y después se mezclan para proporcionar una composición de la invención.

ES 2 328 128 T3

Sin embargo, cuando la composición comprende sacárido capsular del serogrupo A, se prefiere que el sacárido del serogrupo A no se combine con el (los) otro(s) sacárido(s) hasta que se use de manera breve, con el fin de minimizar el potencial de hidrólisis. Esto se puede lograr de manera conveniente teniendo el componente del serogrupo A en forma liofilizada y el (los) otro(s) componente(s) del serogrupo(s) en forma líquida, usándose el componente líquido para reconstituir el componente liofilizado cuando esté listo para uso.

La invención también proporciona una composición de la invención, que comprende sacárido(s) capsular(es) de serogrupos de *N. meningitidis* C, W 135 e Y, donde los sacáridos están en forma líquida. Esta composición se puede envasar con un antígeno de sacárido del serogrupo A liofilizado, para reconstitución, o se puede usar como una composición por sí misma por ejemplo, cuando no se desea la inmunización contra el serogrupo A.

Presentación de composiciones de la invención

Las composiciones de la invención se pueden presentar y envasar de diversas maneras.

Cuando las composiciones son para inyección, se pueden presentar en viales, o se pueden presentar en jeringas llenas listas para uso. Las jeringas se pueden suministrar con o sin agujas. Una jeringa incluirá una única dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una única dosis o múltiples dosis. Usualmente las composiciones inyectables serán soluciones o suspensiones líquidas. De manera alternativa, se pueden presentar en forma de soluciones o suspensiones sólidas para la solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

Sin embargo, las composiciones preferidas son para administración mucosal. De las diversas opciones disponibles de administración mucosal, la más práctica es la vía intranasal ya que ofrece fácil acceso con dispositivos relativamente sencillos que ya se han producido en gran cantidad. De este modo, la composición de la invención se adapta preferiblemente para y/o envasar para la administración intranasal, tal como mediante pulverización nasal, gotas nasales, gel o polvo [por ejemplo, refs 57 y 58].

Las vías alternativas para la administración mucosal de la composición son las vías oral, intragástrica, pulmonar, intestinal, transdérmica, rectal, ocular, y vaginal. De este modo la composición de la invención se puede adaptar para y/o envasar para la administración mucosal [por ejemplo, véanse las refs. 59, 60 y 61]. Por ejemplo, cuando la composición es para la administración oral, puede estar en la forma de comprimidos o cápsulas (opcionalmente con recubrimiento entérico), líquido, material de plantas transgénicas, gotas, inhalador, aerosol, recubrimiento entérico, supositorio, pesario, etc. [véase también la ref. 62, y Capítulo 17 de la ref. 73].

Sea la que sea la vía de administración, las composiciones de la invención se envasan preferiblemente en forma de dosis unitaria. De manera rutinaria se pueden establecer las dosis eficaces. Una dosis típica humana de la composición para inyección o para uso intranasal use tiene un volumen entre 0,1-0,5 ml por ejemplo, dos pulverizaciones de 100 μ l, una por orificio nasal.

Dentro de cada dosis, la cantidad individual de antígeno de sacárido estará en general entre 1-50 μ g (medido como masa de sacárido), siendo preferido 10 μ g de cada uno.

Las composiciones de la invención son preferiblemente estériles. Están preferiblemente sin pirógenos. Están preferiblemente tamponadas por ejemplo, a entre pH 6 y pH 8, en general alrededor de pH 7. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar tampón de histidina [63].

Adyuvantes

Las composiciones en general incluirán uno o más adyuvantes, en las que uno de los adyuvantes es quitosán. El (los) adyuvante(s) se pueden añadir a los sacáridos antes y/o después de que se mezclen para formar una composición de la invención, pero se prefiere combinar el adyuvante con un antígeno de sacárido antes de la mezcla de los diferentes sacáridos.

Sin embargo, no es necesario que cada sacárido deba formar adyuvantes antes de tal mezcla. El exceso de adyuvante se puede incluir en una preparación de sacárido de manera que, cuando un antígeno(s) de sacárido no adyuvantazo(s) se añada(n), el exceso se diluye hasta una concentración deseada. En una realización particular, cuando la composición de la invención se prepara a partir de un antígeno liofilizado (por ejemplo, un componente liofilizado del serogrupo A) se puede preferir que no incluya el adyuvante en el material liofilizado.

Para la administración mucosal, se prefiere usar un adyuvante mucosal. Los adyuvantes mucosales adicionales incluyen, pero no se limitan a: (A) enterotoxina lábil al calor ("LT") de *E. coli*, o los mutantes destoxificados de los mismos [por ejemplo, el capítulo 5 de la ref. 64]; (B) toxina de cólera ("CT"), o los mutantes destoxificados de los mismos [por ejemplo, el capítulo 5 de la ref. 64]; o (C) micropartículas es decir una partícula de ~ 100 nm a ~ 150 μ m de diámetro, más preferiblemente ~ 200 nm a ~ 30 μ m de diámetro, y lo más preferiblemente ~ 500 nm a ~ 10 μ m de diámetro) formado a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(ácido α -hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, un polioctoéster, un polianhídrido, una policaprolactona etc., tal como poli(lactida-co-glicolida) etc.) opcionalmente tratadas para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB); (D) un polioxi-etilén éter

o un polioxi-etilen éster [65]; (E) un tensioactivo polioxi-etilen sorbitan éster en combinación con un octoxinol [66] o un tensioactivo polioxi-etilen alquil éter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional [67]; (F) un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) y una saponina [69]; (G) liposomas [capítulos 13 y 14 de la ref. 73]; (H) imitadores de monofosforil lípido A, tales como derivados de aminoalquil glucosaminida fosfato por ejemplo, RC-529 [70]; (I) polifosfazeno (PCPP); (J) un bioadhesivo [71] tales como microesferas de ácido hialurónico esterificado [72] o un mucoadhesivo seleccionado entre el grupo constituido por derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También están disponibles otros adyuvantes mucosales [por ejemplo, véase el capítulo 7 de la ref. 73].

Además de quitosán y los adyuvantes mucosales proporcionados anteriormente, las composiciones de la invención pueden incluir uno o más adyuvantes seleccionados entre el siguiente grupo: (A) sales de aluminio (alum), tales como hidróxidos de aluminio (incluyendo oxihidróxidos), fosfatos de aluminio (incluyendo hidroxifosfatos), sulfato de aluminio, etc [Capítulos 8 y 9 en la ref. 73]; (B) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como péptidos de muramilo [los péptidos de muramilo incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE), etc.] o componentes de la pared de la célula bacteriana, tales como por ejemplo (a) MF59TM [Capítulo 10 en la ref. 73; 74, 75], que contiene 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85 (conteniendo opcionalmente MTP-PE) formulado en partículas de submicrones usando un microfluidificador, (b) SAF, que contiene 10% de Escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero bloqueado por plurónico L121, y thr-MDP o bien microfluidificado en una emulsión de submicrones o en agitación con un aparato Vortex para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor, y (c) sistema de adyuvante RibiTM (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2% de Escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared bacteriana del grupo constituido por monofosforil lípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL+CWS (DetoxTM); (C) adyuvantes de saponina [capítulo 22 de la ref. 73], tales como QS21 o StimulonTM (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), o bien en una forma simple o en la forma de las partículas generadas a partir de ellos tales como ISCOMs (complejos inmunoestimuladores; capítulo 23 de la ref. 73), cuyo ISCOMS puede estar desprovisto de detergente adicional por ejemplo, la ref. 76; (D) Adyuvante de Freund Completo (CFA) y Adyuvante de Freund Incompleto (IFA); (E) citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [77], etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulador de las colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (F) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) por ejemplo, las refs. 78 y 79, opcionalmente en la ausencia sustancial de alumbre cuando se usa con los sacáridos neumocócicos por ejemplo, ref. 80; (G) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua por ejemplo, las refs. 81, 82 y 83; (H) oligonucleótidos que comprenden los motivos CpG es decir que contienen al menos un dinucleótido CG, con 5-metilcitosina usándose de manera opcional en lugar de citosina; (I) un inmunoestimulador y una partícula de sal de metal por ejemplo, ref. 84; (J) una saponina y una emulsión de aceite en agua por ejemplo, ref. 85; (K) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (de manera opcional + un esteroide) por ejemplo, ref. 86; (L) ARN de doble cadena; (M) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para potenciar la eficacia de la composición [por ejemplo, capítulo 7 de la ref. 73].

Cuando se usa un fosfato de aluminio, es posible adsorber uno o más de los sacáridos a la sal de aluminio, pero se prefiere que no sea así, y esto se favorece mediante la inclusión de los iones fosfato en solución (por ejemplo, mediante el uso de un tampón fosfato). Cuando se usa un hidróxido de aluminio se prefiere adsorber los sacáridos a la sal. Se puede preferir el uso de hidróxido de aluminio como un adyuvante para el sacárido del serogrupo A.

Los adyuvantes mucosales preferidos son quitosán y los mutantes destoxificados de las toxinas bacterianas (particularmente LT). Éstos se pueden usar solos, o se pueden usar de manera ventajosa en combinación, a medida que la co-administración permite las dosis inferiores de la toxina a usar, mejorando por lo tanto la seguridad.

50 *Quitosán*

Quitosán se conoce para uso como un adyuvante [por ejemplo, las refs. 87 a 98], particularmente para uso mucosal (por ejemplo, intranasal). Quitosán (Figura 11) es un derivado N-desacetilado de la quitina del polímero exoesquelético (Figura 12), aunque la N-desacetilación casi nunca está completa. La desacetilación significa que, a diferencia de la quitina, quitosán es soluble en ácidos acético y fórmico acuosos. También se ha encontrado que el quitosán tiene una amplia aplicabilidad en los campos farmacéuticos de no vacuna [99].

El monómero de glucosamina repetitivo de quitosán contiene un grupo amina. Este grupo puede existir como una amina libre (-NH₂) o como una amina catiónica (-NH₃⁺), afectando la protonación a la solubilidad del polímero. Los grupos amina son químicamente activos y pueden estar sustituidos. De particular interés para la invención, los grupos amina pueden estar sustituidos con uno o más grupos alquilo ("A" por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, etc.) por ejemplo, -NHA, -NH₂A⁺, -NA¹A², -NHA¹A² +, -NA¹A²A³ +. Los derivados preferidos son tri-alquilados y se prefieren particularmente los derivados trimetilados (es decir, trimetilquitosán, o "TMC" - Figura 13). Estos derivados tienen una solubilidad acuosa mucho mayor que el quitosán no modificado en un mayor intervalo de pH.

No es necesario para cada amina en el polímero de quitosán que se sustituya de esta manera. El grado de sustitución a lo largo de la cadena de quitosán se puede determinar mediante ¹H-RMN y se puede controlar mediante

- el número y duración de las etapas de reacción [100]. Se prefiere que al menos 10% (por ejemplo, al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de monómeros tengan una amina sustituida. Existen dos razones principales por las que es raro que el 100% de los monómeros en el quitosán llevarán la amina alquilada. Primero, la reacción de sustitución no tendrá usualmente un 100% de eficacia. Segundo, es raro encontrar el quitosán en el que el 100% de las unidades de monómero llevan grupos amina debido a la desacetilación de la quitina no es usualmente eficaz al 100%. Por lo tanto los derivados de quitosán alquilados usados en la invención pueden tener grupos amida y/o no alquilados sobre algunas unidades de monómero, y quitosán puede poseer algunos grupos amida. Quitosán y los derivados usados con la invención están preferiblemente al menos 75% desacetilados.
- Los quitosanos están en una diversidad de pesos moleculares por ejemplo, de oligosacáridos con peso molecular alrededor de 5.000-10.000 a polímeros de alto peso molecular (por ejemplo, 600.000-1.000.000).

Cuando se usa un quitosán o derivado, estará en la forma de una sal por ejemplo, cloruro o lactato.

- El quitosán o derivado puede tener diversas formas físicas por ejemplo en solución, en forma de un polvo, o en forma particulada. Se prefieren las formas particuladas, incluyendo micropartículas, que pueden estar reticuladas o no reticuladas y se pueden formar de manera conveniente mediante secado por pulverización [101, 102]. Otras formas físicas incluyen geles, perlas, películas, esponjas, fibras, emulsiones, etc.
- El término "quitosán" como se usa con referencia a las composiciones, procedimientos, métodos y usos de la invención incluyen todas estas formas y derivados de quitosán.

Toxinas mutantes destoxificadas

- Las exotoxinas ADP-ribosilantes bacterianas que catalizan la transferencia de una unidad de ADP-ribosa de NAD⁺ a una proteína diana se conocen ampliamente. Los ejemplos incluyen toxina de difteria (*Corynebacterium diphtheriae*), exotoxina A (*Pseudomonas aeruginosa*), toxina de cólera (CT; *Vibrio cholerae*), enterotoxina lábil al calor (LT; *E. coli*) y toxina de tos ferina (PT). Además en los ejemplos en las referencias 103 y 104.

- Las toxinas se dividen típicamente en dos dominios funcionalmente distintos - A y B. La subunidad A es responsable de la actividad enzimática tóxica, mientras que la subunidad B es responsable de la unión celular.

- Las subunidades podrían ser dominios sobre la misma cadena de polipéptidos o podrían ser dominios de polipéptidos separados. Las propias subunidades pueden ser oligómeros por ejemplo, la subunidad A de CT consta de A1 y A2 que están unidas mediante un enlace bisulfuro, y su subunidad B es un homopentámero. Típicamente, el contacto inicial con una célula diana está mediado por la subunidad B y después la subunidad A sola entra en la célula.

Las toxinas son típicamente inmunogénicas, pero su inclusión en las vacunas es complicada por su toxicidad.

- Para eliminar la toxicidad sin eliminar también la inmunogenicidad, las toxinas se han tratado con compuestos químicos tales como glutaraldehído o formaldehído. Un planteamiento más racional depende de la mutagénesis dirigida al sitio de los restos activos claves para eliminar la actividad enzimática tóxica mientras se mantiene la inmunogenicidad [por ejemplo, las refs. 105 (CT y LT), 106 (PT), 64 etc.]. Las vacunas para la tos nerviosa acelulares incluyen una forma de toxina de tos ferina con dos sustituciones de aminoácidos (Arg⁹ → Lys y Glu¹²⁹ → Gln; "PT-9K/129G" [107]).

- Además de sus propiedades inmunogénicas, las toxinas se han usado como adyuvantes. La capacidad de formar adyuvantes por vía parenteral se observó en primer lugar en 1972 [108] y la capacidad de formar adyuvantes mucosal en 1984 [109]. Sorprendentemente se encontró en 1993 que las formas destoxificadas de las toxinas mantienen la capacidad de formar adyuvantes [110].

- Las composiciones de la invención pueden incluir la toxina destoxificada de ribosilación ADP. La toxina puede ser toxina de difteria, exotoxina A de *Pseudomonas* o toxina de tos ferina, pero es preferiblemente toxina de cólera (CT) o, más preferiblemente, enterotoxina de *E. coli* lábil al calor (LT). Otras toxinas que se pueden usar son las descritas en la referencia 104 (SEQ IDs 1 a 7 en ella, y sus mutantes).

- La destoxificación de estas toxinas sin pérdida de la actividad inmunogénica y/o adyuvante se puede lograr mediante cualquier medio adecuado, siendo la mutagénesis la preferida. La mutagénesis puede implicar una o más sustituciones, supresiones y/o inserciones.

- Los mutantes destoxificados preferidos son LT que tienen una mutación en el resto Arg-7 (por ejemplo, una sustitución Lys); teniendo una mutación CT en Arg-7 (por ejemplo, una sustitución Lys); teniendo una mutación CT en el resto Arg-11 (por ejemplo, una sustitución Lys); teniendo una mutación LT en Val-53; teniendo una mutación CT en Val-53; teniendo una mutación CT en el resto Ser-61 (por ejemplo, una sustitución Phe); teniendo una mutación LT en el resto Ser-63 (por ejemplo, una sustitución Lys o sustitución Tyr) [por ejemplo, Capítulo 5 de la ref. 111-K63; ref. 112-Y63]; teniendo una mutación CT en el resto Ser-63 (por ejemplo, una sustitución Lys o Tyr); teniendo una mutación LT en el resto Ala-72 (por ejemplo, una sustitución Arg) [113-R72]; teniendo una mutación LT en Val-97; teniendo una mutación CT en Val-97;]; teniendo una mutación LT en Tyr-104;]; teniendo una mutación CT en

ES 2 328 128 T3

5 Tyr-104;]; teniendo una mutación LT en el resto Pro-106 (por ejemplo, una sustitución Ser);]; teniendo una mutación CT en el resto Pro-106 (por ejemplo, una sustitución Ser); teniendo una mutación LT en Glu-112 (por ejemplo, una sustitución Lys); teniendo una mutación CT en Glu-112 (por ejemplo, una sustitución Lys); teniendo una mutación LT en el resto Arg-192 (por ejemplo, una sustitución Gly); teniendo una mutación PT en el resto Arg-9 (por ejemplo, una sustitución Lys); teniendo una mutación PT en Glu-129 (por ejemplo, una sustitución Gly); y cualquiera de los mutantes descritos en la referencia 105.

10 Estas mutaciones pueden estar combinadas por ejemplo, Arg-9-Lys + Glu-129-Gly en PT, o LT con tanto una mutación D53 como una K63, etc.

10 LT con una mutación en el resto 63 ó 72 es una toxina destoxificada preferid. Las toxinas LT-K63 y LT-R72 se prefieren particularmente [114].

15 Se apreciará que la numeración de estos restos se basa en secuencias prototipo y que, por ejemplo, aunque la Ser-63 pueden no estar realmente en el aminoácido 63 en una variante LT dada, una alineación se secuencias de aminoácidos revelarán la localización correspondiente a Ser-63.

20 Las toxinas destoxificadas pueden estar en la forma de subunidades A y/o B según sea apropiada para la actividad adyuvante.

20 Componentes adicionales de las composiciones

25 Además del antígeno de sacáridos de meningocócicos, composiciones de la invención puede incluir antígenos de proteína de meningococos. Se prefiere incluir proteínas del serogrupo B de *N. meningitidis* [por ejemplo, las refs. 115 a 120] o preparaciones OMV [por ejemplo, las refs. 121 a 124 etc.].

30 Los antígenos no meningocócicos de no neisseria, preferiblemente los que no disminuyen la respuesta inmune contra los componentes meningocócicos, también pueden estar incluidos. La ref. 125, por ejemplo, describe combinaciones de oligosacáridos de los serogrupos B y C de *N. meningitidis* conjuntamente con el sacárido Hib. Se prefieren los antígenos de neumococos, virus de hepatitis A, virus de hepatitis B, *B. tos ferina*, difteria, tétanos, *Helicobacter pylori*, polio y/o *H. influenzae*. Los antígenos particularmente preferidos de no neisseria incluyen:

35 - antígenos de *Helicobacter pylori* tales como CagA [126 a 129], VacA [130, 131], NAP [132, 133, 134], HopX [por ejemplo 135], HopY [por ejemplo, 135] y/o ureasa.

- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, 136, 137, 138].

- un antígeno de sacárido virus de hepatitis A virus, tal como virus inactivado [por ejemplo, 139, 140].

40 - un antígeno de virus de hepatitis B, tales como los antígenos de superficie y/o de núcleo [por ejemplo, 140, 141], estando el antígeno de superficie preferiblemente adsorbido sobre un fosfato de aluminio [142].

- a antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, 9], preferiblemente no-adsorbido o adsorbido sobre un fosfato de aluminio [143].

45 - un antígeno de virus de hepatitis C [por ejemplo, 144].

- un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo, 115 a 118].

50 - un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, las refs. 145 a 146, 147, 148, 149, 150, 151].

- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo, 152].

- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo, 153].

55 - polio antígeno(s) [por ejemplo, 154, 155] tal como IPV.

- antígeno(s) de rabia [por ejemplo, 156] tal como virus inactivado liofilizado [por ejemplo, 157, RabAvert™].

60 - antígenos de sarampión, paperas y/o rubéola [por ejemplo, los capítulos 12, 13 y 17 de la ref. 1].

- antígeno(s) de influenza [por ejemplo, los capítulo 21 de la ref. 1], tales como la hemaglutinina y/o proteínas de superficie de neuraminidasa.

65 - un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 158].

- un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) [por ejemplo, 159, 160].

ES 2 328 128 T3

- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A) [por ejemplo, 160, 161, 162].

- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 163].

5 - antígeno(s) de paramixovirus tal como virus sincitial respiratorio (RSV [164, 165]) y/o virus de parainfluenza (PIV3 [166]).

- un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo, 167, 168, 169].

10 - un antígeno de un virus en la familia flaviviridae (género flavivirus), tal como el virus de la fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, cuatro serotipos de virus Dengue, virus de encefalitis de origen en las garrapatas, virus West Nile.

15 - un antígeno de pestivirus, tal como virus de la fiebre pocina clásico, virus de la diarrea viral bovina, y/o virus de la enfermedad de la frontera.

- un antígeno de parvovirus por ejemplo, del parvovirus B19.

20 - un toxoide de tétanos [por ejemplo, capítulo 18 de la ref. 1]

- holotoxina de tos ferina (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. tos ferina*, de manera opcional también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, las refs. 170 y 171].

25 - antígeno de tos ferina celular.

30 La mezcla puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales, que se pueden destoxificar cuando sea necesario (por ejemplo, la destoxificación de toxina de tos ferina mediante medios químicos y/o genéticos). Cuando un antígeno de difteria está incluido en la mezcla se prefiere también incluir antígeno de tétanos y antígenos de tos ferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de tétanos se prefiere incluir antígenos de difteria y de. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de tos ferina se prefiere también incluir antígenos difteria y de tétanos.

35 Los antígenos en la mezcla típicamente estarán presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno será suficiente para inducir una respuesta inmune contra ese antígeno.

40 Se puede preferir no incluir los tres (1) un sacárido meningocócico, (2) un antígeno que induce una respuesta inmune contra *Haemophilus influenzae*, y (3) un antígeno que induce una respuesta inmune contra *Streptococcus pneumoniae* conjuntamente en la composición de la invención. Sin embargo si estos tres antígenos están incluidos en la misma composición, se prefiere que la composición incluya un derivado alquilado de quitosán (por ejemplo, trimetilquitosán) como un adyuvante.

45 Una alternativa para usar antígenos de proteínas en la mezcla, se puede usar el ácido nucleico que codifica antígeno. Los componentes proteicos de la mezcla pueden estar de esta manera reemplazados por ácido nucleico (preferiblemente ADN por ejemplo, en la forma de un plásmido) que codifica la proteína. De manera similar, las composiciones de la invención pueden comprender proteínas que imitan al antígeno de sacáridos por ejemplo, mimotopes [172] o anticuerpos anti-idiotipo.

50 Éstos pueden ser componentes de sacarina individuales, o pueden suplementarlos. Como ejemplo, la vacuna puede comprender una imitación de péptido del polisacárido capsular MenC [173] o MenA [174] en lugar del propio sacárido.

55 Las composiciones de la invención pueden comprender detergente (por ejemplo, un Tween, tal como Tween 80) a niveles (por ejemplo < 0,01%). Las composiciones de la invención pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o trehalosa por ejemplo, a aproximadamente 15 mg/ml, particularmente si se tienen que liofilizar o si incluyen material que se ha reconstituido a partir de material liofilizado.

Inmunogenicidad

Las composiciones de la invención son inmunogénicas. Las composiciones inmunogénicas preferidas son vacunas.

60 Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser o bien profilácticos (es decir, para prevenir infección) o terapéuticos (es decir, para tratar la enfermedad después de la invención), pero típicamente serán profilácticos.

65 Las composiciones y vacunas inmunogénicas de la invención típicamente comprenderán, además de los sacáridos meningocócicos, “vehículos farmacéuticamente aceptables”, que incluyen cualquier vehículo que el por sí mismo no induce la producción de anticuerpos peligrosos para la recepción individual de la composición. Los vehículos adecuados son típicamente grandes, macromoléculas metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, trehalosa [175], agregados

ES 2 328 128 T3

lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas), y partículas de virus inactivas. Tales vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las vacunas también pueden estar en contacto con diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. De manera adicional, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes de humectación y de emulsificación, sustancias de tamponación de pH, y similares. Una discusión completa de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la ref. 176.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno de sacárido, así como cualquier otro de los otros componentes mencionados anteriormente, según se necesite. Por “cantidad inmunológicamente eficaz”, significa que la administración de la cantidad a un individuo, o bien en una única dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la afección de salud y física del individuo a tratar, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar los anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración del doctor que está tratando la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente alto que se puede determinar mediante ensayos rutinarios.

La inmunogenicidad de las composiciones de la invención se pueden determinar administrándolas a sujetos de ensayo (por ejemplo, niños 12-16 meses de edad, o modelos de animales [177]) y después determinando los parámetros convencionales incluyendo anticuerpos bactericidas en suero (SBA) y titulaciones de ELISA (GMT) de IgG total anti-cápsula de alta actividad. Estas respuestas inmunes en general se determinarán alrededor de 4 semanas después de la administración de la composición, y se comparan con los valores determinados antes de la administración de la composición. Se prefiere un incremento de SBA de al menos 4 veces u 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, se debe realizar más de una determinación después de la administración.

25 *Administración de composiciones de la invención*

Como se ha mencionado anteriormente, las composiciones de la invención se pueden administrar mediante diversas vías, incluyendo la parenteral y la mucosal. Una vía preferida de la administración parenteral es inyección. La inyección puede ser subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular. Se prefiere la administración intramuscular al muslo. Se puede usar la inyección sin aguja. Una vía preferida de administración mucosal es intranasal. La administración transdérmica o transcutánea es también posible (por ejemplo, véase la ref. 178).

La administración puede ser un programa de una sola dosis o un programa de dosis múltiple. A un programa de dosis primario puede seguir un programa de dosis de refuerzo. La programación adecuada entre el cebado y refuerzo se puede determinar de manera rutinaria.

La administración en general será a un animal y, en particular, se pueden tratar sujetos humanos. Las composiciones son particularmente útiles para la vacunación de niños y adolescentes.

40 *Procedimientos y usos médicos*

La invención proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmune en un paciente, que comprende la administración al paciente de una composición de la invención. La respuesta inmune es preferiblemente protectora contra la enfermedad meningocócica, y pueden comprender una respuesta inmune humoral y/o una respuesta inmune celular. La respuesta inmune y/o la administración es/son preferiblemente ambas mucosal.

El paciente es preferiblemente un niño. Una clase preferida adicional de paciente es una mujer adulta, y particularmente una mujer de edad que está criando un niño o una mujer embarazada. Las composiciones de la invención son particularmente adecuadas para inmunizar de manera pasiva a los niños mediante la vía maternal.

El procedimiento puede inducir una respuesta inmune, en un paciente que ya se ha cebado contra *N. meningitidis*.

La invención también proporciona el uso de sacáridos capsulares del serogrupo C de *N. meningitidis* y sacárido capsular de I o más de los serogrupos A, W135 e Y de *N. meningitidis*, en los que dichos sacáridos capsulares están conjugados a la(s) proteína(s) vehículo y/o son oligosacáridos, en la fabricación de un medicamento para la administración intranasal a un animal con el fin de inducir una respuesta inmune. La invención también proporciona el uso de (1) un sacárido capsular del serogrupo, C, de *N. meningitidis*, en el que dichos sacáridos capsulares están conjugados a la(s) proteína(s) vehículo y/o son oligosacáridos, y (2) un quitosán, en la fabricación de un medicamento para la administración intranasal a un animal con el fin de inducir una respuesta inmune.

Estos medicamentos son preferiblemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad provocada por *Neisseria* (por ejemplo, meningitis, septicemia, gonorrea etc.). Son preferiblemente para la administración intranasal. Preferiblemente comprenden sacáridos capsulares de al menos dos (es decir, 2, 3 ó 4) de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*.

Definiciones

El término “que comprende” significa “que incluye” así como “que constituye” por ejemplo, una composición “que comprende” X puede constar exclusivamente de X o puede incluir algo adicional por ejemplo, X + Y.

El término “aproximadamente” en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente” por ejemplo, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra “sustancialmente” se puede omitir de la definición de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la preparación de un conjugado de oligosacárido.

Las Figuras 2, 5 y 8 muestran los datos de IgG en suero de los ejemplos. Figuras 3, 6 y 9 muestran los datos de BCA en suero de los ejemplos. Las Figuras 4, 7 y 10 muestran los datos de proliferación en bazo de los ejemplos.

Las Figuras 11 a 13 muestran las estructuras de repetición de (11) quitosán (12) quitina y (13) trimetilquitosán.

La Figura 14 muestra las titulaciones de ELISA de IgG (14A) y titulaciones bactericidas (14B) usando TMC y/o LT-K63.

La Figura 15 muestra las titulaciones de IgA en suero (15A) y lavados nasales (15B) para los mismos experimentos, y

La Figura 16 muestra los resultados de un ensayo de proliferación en bazo que varía con la concentración de CRM197 ($\mu\text{g/ml}$).

La Figura 17 muestra las titulaciones de IgG en suero obtenidas después de tres dosis de antígeno MenC con adyuvante de quitosán.

La Figura 18 muestra las titulaciones de IgA nasales para los mismos experimentos, y la Figura 19 muestra los anticuerpos bactericidas en suero para los mismos experimentos.

Modos para llevar a cabo la invención*Vacuna del serogrupo C de meningococos*

Un conjugado de oligosacárido C de meningococos CRM₁₉₇ [6,9] se administró por vía intranasal a 1 μg por dosis (medido como sacárido) a ratones usando cloruro de N-trimetil-quitosán [179] y/o adyuvantes LT-K63. Se usó TMC como 8 μg por dosis, y se prepare a partir de quitosán (“Chitoclear”, Primex ehf, Islandia) a partir de cáscaras de camarón (94,5% acetilado) con 18,9% de sustitución. Se usó LT-K63 a 1 ó 0,1 μg por dosis. Se inmunizaron hembras no anestesiadas de BALB/c los días 0, 21, 35 con las formulaciones en volúmenes de 10 μl (5 μl por orificio nasal). Se recogieron muestras de suero antes y después de cada inmunización. Se recogieron lavados nasales diez días después de la tercera inmunización. Se determinaron mediante ELISA las titulaciones de IgG e IgA específicas para MenC y para LT [180].

Las respuestas de IgG en suero se muestran en la Figura 14: (A) ELISA y (B) bactericida (escala log). La Figura 15 muestra las titulaciones de IgA

En (A) suero y (B) lavados nasales. La Figura 16 muestra los resultados de un ensayo de proliferación en bazo.

Los datos muestran que TMC solo potencia la inmunogenicidad y que TMC potencia la inmunogenicidad cuando se administra conjuntamente con adyuvante LT-K63. Los ratones que recibían 1 μg de LT-K63 y TMC combinados lograron titulaciones de IgG comparables con las obtenidas mediante inmunización subcutánea.

Además, los adyuvantes combinados de ambas dosis proporcionaron iguales o mejores respuestas de anticuerpos bactericidas en suero que la inmunización subcutánea. La inmunización subcutánea no dio lugar a una respuesta de IgA específica de MenC en lavados nasales.

TMC y LTK-63 son así adyuvantes intranasales para el antígeno de sacárido MenC, o bien solos o en combinación. De manera ventajosa, la adición de TMC a LT-K63 permite que la dosis de LT-K63 se reduzca en un 90% sin pérdida de inmunogenicidad. De este modo TMC permite que los componentes con toxicidad residual potencial se reduzca sin pérdida de inmunogenicidad.

ES 2 328 128 T3

Se realizaron experimentos similares usando quitosán no metilado 'Chitoclear' como adyuvante. Los ratones recibieron el mismo antígeno conjugado a 2,5 μg de sacárido por dosis, pero con LT-K63 (1 μg) y/o quitosán (10 ó 20 μg), por la misma vía. Se usaron seis grupos de ratones:

Grupo	1	2	3	4	5	6
Alumbre	+	-	-	-	-	-
LT-K63	-	+	-	-	+	+
Quitosán	-	-	10 μg	20 μg	10 μg	20 μg
Vía	s.c.	i.n.	i.n.	i.n.	i.n.	i.n.

Como se muestra en las Figuras 17 a 19, la administración intranasal con LT- K63 y quitosán, en comparación con la administración subcutánea con alumbre, proporcionó respuestas de IgG y bactericidas en suero equivalentes, y dio como resultado respuestas nasales de IgA.

Vacuna combinada

Una composición combinada de conjugados de oligosacárido ACWY se preparó usando los materiales descritos en la referencia 8. La composición se tamponó a pH 7,4 con PBS. La concentración de cada conjugado fue:

	Concentración de sacáridos ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Concentración de CRM ₁₉₇ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
A	487,50	1073,4
C	656,00	968,5
W	939,70	918,0
Y	583,70	837,1

La composición se administró por vía intranasal a ratones en volúmenes de 10 μl (5 μl por fosa nasal) sin adyuvante o con uno de los siguientes adyuvantes mucosales:

Adyuvante	Concentración ($\mu\text{g}/\text{dosis}$)
LT-K63	1
Quitosán	25
Trimetilquitosán (TMC)	25
LT-K63 + TMC	Como antes (1 + 25)

ES 2 328 128 T3

Para comparación, se administró la misma composición de antígeno por vía subcutánea con un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Como control, se administró solo el conjugado de MenC con los mismos adyuvantes por las mismas vías a una concentración equivalente a la de MenC en la composición de combinación.

Por lo tanto diez grupos de ratones recibieron las siguientes composiciones:

Nº	Antígeno	Antígeno (Pg)	Adyuvante	Adyuvante (µg)
1	ACWY	4	Alumbre (s.c.)	500
2	C	1	Alumbre (s.c.)	500
3	ACWY	4	-	-
4	C	1	-	-
5	ACWY	4	LTK63	1
6	C	1	LTK63	1
7	ACWY	4	TMC	25
8	C	1	TMC	25
9	ACWY	4	TMC+LTK63	25 + 1
10	C	1	TMC+LTK63	25 + 1

En un primer conjunto de experimentos, los niveles de IgG en suero después de 3 dosis intranasales (subcutánea para alumbre) eran como sigue, expresados como GMT (MEU/ml) _ standard deviation (Figura 2):

Nº	Anti- MenA	Anti- MenC	Anti- MenW	Anti- MenY
1	356 ± 2,5	310 ± 2	176 ± 4	479 ± 1
2	2	996 ± 1	2	2
3	10 ± 8	11 ± 4	4 ± 5	34 ± 2

ES 2 328 128 T3

4	2	3 ± 3	2	2
5	81 ± 3	54 ± 3	22 ± 2	162 ± 2
6	10	246 ± 2	7	8
7	21 ± 2	42 ± 2	11 ± 3	79 ± 1
8	2	94 ± 4	2	2
9	140 ± 4	103 ± 4	118 ± 2	285 ± 2
10	2	205 ± 1	2	2

Se ensayaron los mismos animales para determinar los anticuerpos bactericidas en suero en la presencia de complemento de conejo infantil.

Las cepas usadas fueron A-F6124, C-C11, W135-5554 e Y-240539.

Los resultados fueron como sigue (Figura 3):

Nº	Anti-MenA	Anti-MenC	Anti-MenW	Anti-MenY
1	512	1024	2048	8192
2	-	8192	-	-
3	64	128	96	8192
4	-	64	-	-
5	256	1024	1024	8192
6	-	4096	-	-
7	128	256	48	8192
8	-	512	-	-
9	2048	4096	1024	8192
10	-	2048	-	-

También se ensayó la proliferación de células en el bazo para los mismos 10 grupos. Los resultados para los grupos con números impares, que recibieron los antígenos MenACWY, se muestran en la Figura 4A; los grupos, con números pares que recibieron solamente MenC, están en la Figura 4B.

ES 2 328 128 T3

En un segundo conjunto de experimentos, los ratones recibieron 20 μ l de las siguientes composiciones ACWY (cada antígeno como 2 μ g de sacárido) por vía intranasal, excepto para el grupo 1 que lo recibió por vía subcutánea:

Nº	Adyuvante	Adyuvante (μ g)
1	Alum_(s.c.)	500
2	Alum_(i.n.)	500
3	LTK63	1
4	TMC	1
5	TMC	122
6	LTK63 +TMC	1+ 61
7	LTK63+TMC	1+122
8	Quitosán	61
9	Quitosán	122
10	LTK63 + quitosán	1 + 61
11	LTK63 + quitosán	1+122

IgG en suero después de tres inmunizaciones se muestran en la Figura 5, BCA en suero se muestra en la Figura 6, y la proliferación celular se muestra en las Figuras 7A y 7B.

En un tercer conjunto de experimentos similares, los ratones recibieron 20 μ l de las siguientes composiciones ACWY (cada antígeno como 2 μ g de sacárido) por vía intranasal, excepto para el grupo 1 que lo recibió por vía subcutánea.

Nº	Adyuvante	Adyuvante (μ g)
1	Alumbre (s.c.)	500
2	-	-
3	LTK63	1
4	LTK63	0,1
5	TMC	61
6	LTK63 +TMC	1+ 61
7	LTK63+TMC	0,1+61
8	Quitosán	61
9	LTK63 + quitosán	1 + 61
10	LTK63 + quitosán	0,1 + 61

ES 2 328 128 T3

IgG en suero después de tres inmunizaciones se muestran en la Figura 8, BCA en suero se muestra en la Figura 9, y la proliferación celular se muestra en las Figuras 10A y 10B.

De este modo tanto LTK63 como TMC, y particularmente el emparejamiento de los mismos, son adyuvantes altamente eficaces para la administración intranasal de una vacuna combinada contra los serogrupos A, C, W 135 e Y de meningococos.

Referencias (cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia)

- 10 [1] **Vaccines** (Plotkin & Orenstein) 3ª edición (1999) ISBN 0-7216-7443-7.
- [2] **Armand et al.** (1982) *J. Biol. Stand.* 10: 335-339.
- 15 [3] **Cadoz et al.** (1985) *Vaccine* 3: 340-342.
- [4] MMWR (1997) 46 (RR-5) 1-10.
- [5] **Baklaic et al.** (1983) *Infect. Immun.* 42: 599-604.
- 20 [6] **Costantino et al.** (1992) *Vaccine* 10: 691-698.
- [7] Documento WO02/00249.
- [8] Documento WO 03/007985.
- 25 [9] **Costantino et al.** (1999) *Vaccine* 17: 1251-1263.
- [10] **Frash** (1990) p. 123-145 de *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- 30 [11] **Inzana** (1987) *Infect. Immun.* 55: 1573-1579.
- [12] Solicitud de Patente Internacional PCT/IB03/01436.
- [13] **Ravenscroft et al.** (1999) *Vaccine* 17: 2802-2816.
- 35 [14] **Ramsay et al.** (2001) *Lancet* 357 (9251): 195-196.
- [15] **Lindberg** (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2: S28-36.
- 40 [16] **Buttery & Moxon** (2000) *JR Coll Physicians Lond* 34: 163-168.
- [17] **Ahmad & Chapnick** (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13: 113-133, vii.
- [18] **Goldblatt** (1998) *J. Med. Microbiol.* 47: 563-567.
- 45 [19] Patente Europea 0477508.
- [20] Patente de Estados Unidos 5.306.492.
- 50 [21] Documento WO98/42721.
- [22] **Dick et al.** en *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse et al.) Karger, Basel, 1989, Vol. 10, p. 48-114.
- [23] Hermanson Bioconjugate Techniques, *Academic Press*, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- 55 [24] Anónimo (Enero 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [25] **Anderson** (1983) *Infect Immun* 39 (1): 233-238.
- 60 [26] **Anderson et al.** (1985) *J Clin Invest* 76 (1): 52-59.
- [27] Documento EP-A-0372501.
- [28] Documento EP-A-0378881.
- 65 [29] Documento EP-A-0427347.
- [30] Documento WO93/17712

ES 2 328 128 T3

- [31] Documento WO94/03208.
- [32] Documento WO98/58668.
- 5 [33] Documento EP-A-0471177.
- [34] Documento WO91/01146
- [35] **Falugi et al.** (2001) *Eur J Immunol* 31: 3816-3824.
- 10 [36] Documento WO00/56360.
- [37] Documento WO00/61761.
- 15 [38] Documento WO99/42130
- [39] Documento WO96/40242
- [40] **Lees et al.** (1996) *Vaccine* 14: 190-198.
- 20 [41] Documento WO95/08348.
- [42] Patente de Estados Unidos 4.882.317
- 25 [43] Patente de Estados Unidos 4.695.624
- [44] *Mol. Immunol.*, 1985, 22, 907-919
- [45] Documento EP-A-0208375
- 30 [46] Documento WO00/10599
- [47] **Gever et al.**, *Med. Microbiol. Immunol.*, 165: 171-288 (1979).
- 35 [48] Patente de Estados Unidos 4.057.685.
- [49] Patente de Estados Unidos 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [50] Patente de Estados Unidos 4.459.286.
- 40 [51] Patente de Estados Unidos 4.965.338
- [52] Patente de Estados Unidos 4.663.160.
- 45 [53] Patente de Estados Unidos 4.761.283
- [54] Patente de Estados Unidos 4.356.170
- [55] **Lei et al.** (2000) *Dev Biol (Basel)* 103: 259-264.
- 50 [56] Documento WO00/38711; Patente de Estados Unidos 6.146.902.
- [57] **Almeida & Alpar** (1996) *J. Drug Targeting* 3: 455-467.
- 55 [58] **Agarwal & Mishra** (1999) *Indian J Exp Biol* 37: 6-16.
- [59] **Walker** (1994) *Vaccine* 12: 387-400.
- [60] **Clements** (1997) *Nature Biotech.* 15: 622-623.
- 60 [61] **McGhee et al.** (1992) *Vaccine* 10: 75-88.
- [62] **Michetti** (1998) *J. Gastroenterol.* [Suppl X]: 66-68.
- 65 [63] Solicitud de Patente Internacional WO03/009869.
- [64] Del **Giudice et al.** (1998) *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 19, número 1.

ES 2 328 128 T3

- [65] Solicitud de Patente Internacional WO99/52549.
- [66] Solicitud de Patente Internacional WO01/21207.
- 5 [67] Solicitud de Patente Internacional WO01/21152.
- [68] Solicitud de Patente Internacional WO99/27960.
- [69] Solicitud de Patente Internacional WO00/62800.
- 10 [70] **Johnson et al.** (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2273-2278.
- [71] Solicitud de Patente Internacional WO00/50078.
- 15 [72] **Singh et al.** (2001) *J. Cont. Rele.* 70: 267-276.
- [73] Vaccine design: the subunit and adyuvant approach, eds. Powell y Newman, *Plenum Press 1995* (ISBN 0-306-44867-X).
- 20 [74] Documento WO90/14837
- [75] Patente de Estados Unidos 6.299.884.
- [76] Documento WO00/07621.
- 25 [77] Documento WO99/44636.
- [78] Documento GB-2220221.
- 30 [79] Documento EP-A-0689454.
- [80] Documento WO00/56358.
- [81] Documento EP-A-0835318.
- 35 [82] Documento EP-A-0735898.
- [83] Documento EP-A-0761231.
- 40 [84] Documento WO00/23105.
- [85] Documento WO99/11241.
- [86] Documento WO98/57659.
- 45 [87] Documento WO96/09805 (véase también la Patente de Estados Unidos 5.912.000).
- [88] Documento WO96/10421 (véase también la Patente de Estados Unidos 6.048.536).
- 50 [89] Documento WO97/01330.
- [90] Documento WO97116208 (véase también la Patente de Estados Unidos 6.136.606).
- [91] Documento WO97/20576 (véase también la Patente de Estados Unidos 6.391.318).
- 55 [92] Documento WO98/42374.
- [93] Documento WO01/35994.
- 60 [94] van der **Lubben et al.** (2001) *Eur. J. Pharm. Sci.* 14: 201-207.
- [95] Le **Buanec et al.** (2001) *Biomed. Pharmacother.* 55: 316-320.
- [96] **Seferian & Martinez** (2000) *Vaccine* 19: 661-668.
- 65 [97] **Jabbal-Gill et al.** (1998) *Vaccine* 16: 2039-2046.
- [98] **Marcinkiewicz et al.** (1991) *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (Warsz) 39: 127-132.

ES 2 328 128 T3

- [99] **Singla & Chawla** (2001) *J. Pharm. Pharmacol.* 53: 1047-1067.
- [100] **Hwang et al.** (2002) *J. Agric. Food Chem.* 50: 1876-1882.
- 5 [101] **He et al.** (1999) *Int. J. Pharm.* 187: 53-65.
- [102] **He et al.** (1999) *J. Microencapsul.* 16: 343-355.
- [103] The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Alouf y Freer) ISBN 0120530759.
- 10 [104] Documento WO 02/079242.
- [105] Solicitud de Patente Internacional WO93/13202.
- 15 [106] Solicitudes de Patentes Europeas 0306618, 0322533 y 0322115.
- [107] Patente Europea 0396964.
- [108] **Northrup & Fauci** (1972) *J. Infect. Dis.* 125: 672ff.
- 20 [109] **Elson & Ealding** (1984) *J. Immunol.* 133: 2892ff y 132: 2736ff.
- [110] Solicitud de Patente Internacional WO95/17211.
- 25 [111] Del **Giudice et al.** (1998) *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 19, número 1.
- [112] **Park et al.** (2000) *Exp. Mol. Med.* 32: 72-8.
- [113] Solicitud de Patente Internacional WO98/18928.
- 30 [114] **Pizza et al.** (2000) *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 455-461.
- [115] Documento WO99/24578.
- 35 [116] Documento WO99/36544.
- [117] Documento WO99/57280.
- [118] Documento WO00/22430.
- 40 [119] **Tettelin et al.** (2000) *Science* 287: 1809-1815.
- [120] **Pizza et al.** (2000) *Science* 287: 1816-1820.
- 45 [121] Documento WO01/52885.
- [122] **Bjune et al.** (1991) *Lancet* 338 (8775): 1093-1096.
- [123] **Fukasawa et al.** (1999) *Vaccine* 17: 2951-2958.
- 50 [124] **Rosenqvist et al.** (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92: 323-333.
- [125] Documento WO96/14086.
- 55 [126] **Covacci & Rappuoli** (2000) *J. Exp. Med* 19: 587-592.
- [127] Documento WO93/118150.
- [128] **Covacci et al.** (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5791-5795.
- 60 [129] **Tummuru et al.** (1994) *Infect. Immun.* 61: 1799-1809.
- [130] **Marchetti et al.** (1998) *Vaccine* 16: 33-37.
- 65 [131] **Telford et al.** (1994) *J. Exp. Med* 179: 1653-1658.
- [132] **Evans et al.** (1995) *Gene* 153: 123-127.

ES 2 328 128 T3

- [133] Documento WO96/01272 & WO96/01273 especialmente la SEQ ID NO: 6.
- [134] Documento WO97/25429.
- 5 [135] Documento WO98/04702.
- [136] **Watson** (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 331-332.
- [137] **Rubin** (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 269-285, v.
- 10 [138] **Jedrzejak** (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 187-207.
- [139] **Bell** (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 1187-1188.
- 15 [140] **Iwarson** (1995) *APMIS* 103: 321-326.
- [141] **Gerlich et al.** (1990) *Vaccine* 8 Suppl: S63-68 y 79-80.
- [142] Documento WO93/24148.
- 20 [143] Documento WO97/00697.
- [144] **Hsu et al.** (1999) *Clin Liver Dis* 3: 901-915.
- 25 [145] Documento WO02/02606.
- [146] **Kalman et al.** (1999) *Nature Genetics* 21: 385-389.
- [147] **Read et al.** (2000) *Nucleic Acids Res* 28: 1397-406.
- 30 [148] **Shirai et al.** (2000) *J. Infect. Dis.* 181 (Suppl 3): S524-S527.
- [149] Documento WO99/27105.
- 35 [150] Documento WO00/27994.
- [151] Documento WO00/37494.
- [152] Documento WO99/28475.
- 40 [153] **Ross et al.** (2001) *Vaccine* 19: 4135-4142.
- [154] **Sutter et al.** (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 287-308.
- 45 [155] **Zimmerman y Spann** (1999) *Am Fam Physician* 59: 113-118, 125-126.
- [156] **Dreesen** (1997) *Vaccine* 15 Suppl: S2-6.
- [157] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16; 47 (1): 12, 19.
- 50 [158] **McMichael** (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1: S101-107.
- [159] **Schuchat** (1999) *Lancet* 353 (9146): 51-6.
- 55 [160] Documento WO02/34771.
- [161] **Dale** (1999) *Infect Dis Clin NorthAm* 13: 227-43, viii.
- [162] **Ferretti et al.** (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- 60 [163] **Kuroda et al.** (2001) *Lancet* 357 (9264): 1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219.
- [164] **Anderson** (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1: S59-65.
- 65 [165] **Kahn** (2000) *Curr Opin Pediatr* 12: 257-262.
- [166] **Crowe** (1995) *Vaccine* 13: 415-421.

ES 2 328 128 T3

[167] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39: 85-100.

[168] **Demicheli et al.** (1998) *Vaccine* 16: 880-884.

5 [169] **Stepanov et al.** (1996) *J Biotechnol* 44: 155-160.

[170] **Gustafsson et al.** (1996) *N. Engl. J. Med.* 334: 349-355.

10 [171] **Rappuoli et al.** (1991) *TIBTECH* 9: 232-238.

[172] **Charalambous y Feavers** (2001) *J Med Microbiol* 50: 937-939.

[173] **Westerink** (2001) *Int Rev Immunol* 20: 251-261.

15 [174] **Grothaus et al.** (2000) *Vaccine* 18: 1253-1263.

[175] Documento WO00/56365.

20 [176] **Gennaro** (2000) Remington. *The Science and Practice of Pharmacy*. 20^a ed ISBN: 0683306472

[177] Documento WO01/30390.

[178] Documento WO98/20734.

25 [179] Van der **Lubben et al.** (2002) *S T P Pharm. Sci.* 12: 235-242.

[180] **Baudner et al.** (2002) *Infect. Immun.* 70: 4785-4790

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 328 128 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica, que comprende (a) un antígeno de sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*, y (b) un adyuvante de quitosán.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende (c) uno o más antígenos adicionales y/o (d) uno o más adyuvantes adicionales.
- 10 3. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que los sacáridos capsulares son oligosacáridos.
4. La composición de la reivindicación 2, en la que los sacáridos capsulares son oligosacáridos conjugados a la(s) proteína(s) vehículo(s).
- 15 5. La composición de cualquier reivindicación precedente, que comprende sacáridos capsulares de 2, 3 ó 4 de los serogrupos, A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*.
6. La composición de la reivindicación 5, que comprende sacáridos de los serogrupos A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, C+W135+Y, o A+C+W135+Y.
- 20 7. La composición de cualquier reivindicación precedente, que está adaptada y/o envasadas para administración intranasal.
8. La composición de la reivindicación 7, en forma de una pulverización nasal o gotas nasales.
- 25 9. Las composiciones de cualquier reivindicación precedente, que comprende un adyuvante de quitosán y un mutante destoxificado de toxina de *E. coli* termolábil.
10. La composición de la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que el quitosán es un quitosán trialquilado.
- 30 11. La composición de la reivindicación 10, en la que quitosán es trimetilquitosán.
12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que el mutante destoxificado de toxina de *E. coli* termolábil tiene una sustitución serina a lisina en el resto 63.
- 35 13. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición no incluye ambos de (1) un antígeno que induce una respuesta inmune contra *Haemophilus influenzae*, y (2) un antígeno que induce una respuesta inmune contra *Streptococcus pneumoniae*.
- 40 14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende de manera adicional los tres de (1) un sacárido meningocócico, (2) un antígeno que induce una respuesta inmune contra *Haemophilus influenzae*, y (3) y antígeno que induce una respuesta inmune contra *Streptococcus pneumoniae*, y un derivado alquilado de quitosán.
- 45 15. El uso de (1) un sacárido capsular de al menos uno de los serogrupos, A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*, en el que dichos sacáridos capsulares están conjugados a la(s) proteína(s) vehículo(s) y/o son oligosacáridos, y (2) un quitosán, en la fabricación de un medicamento para la administración mucosal a un animal con el fin de inducir una respuesta inmune.
- 50 16. El uso de la reivindicación 15, en el que medicamento es para la administración intranasal.
- 55
- 60
- 65

FIGURA 1

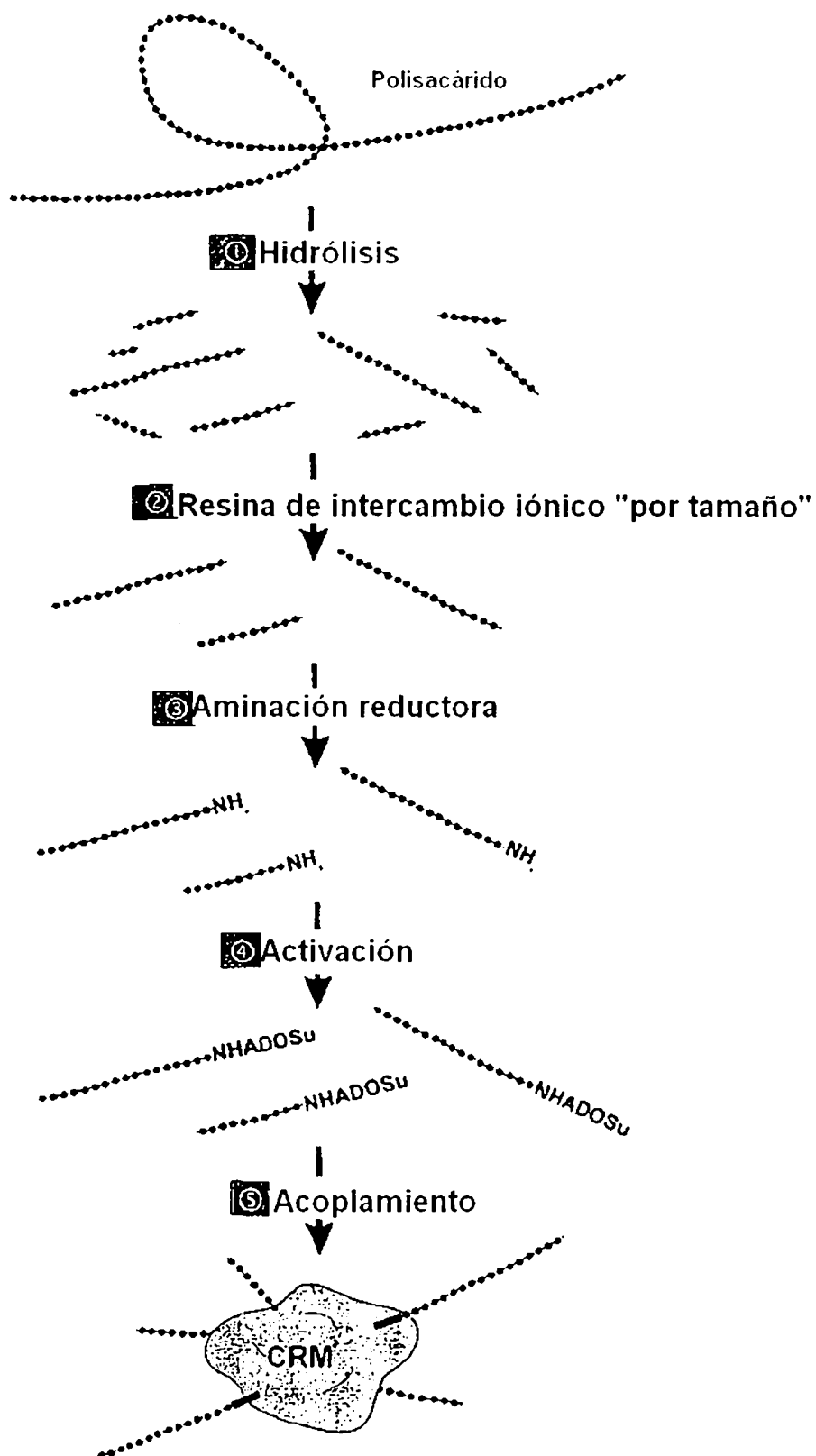


FIGURA 2

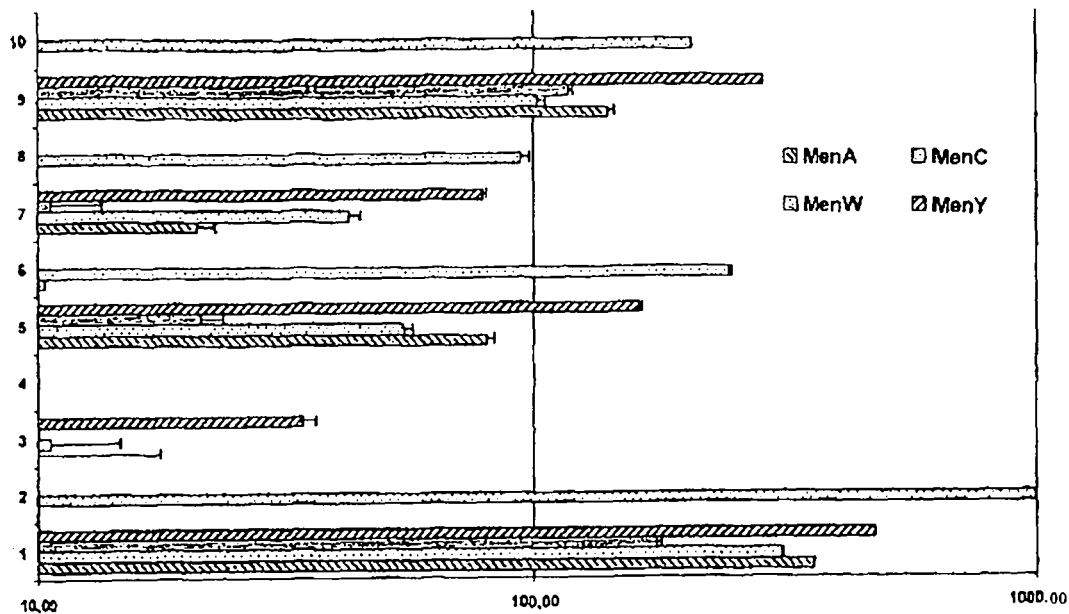


FIGURA 3

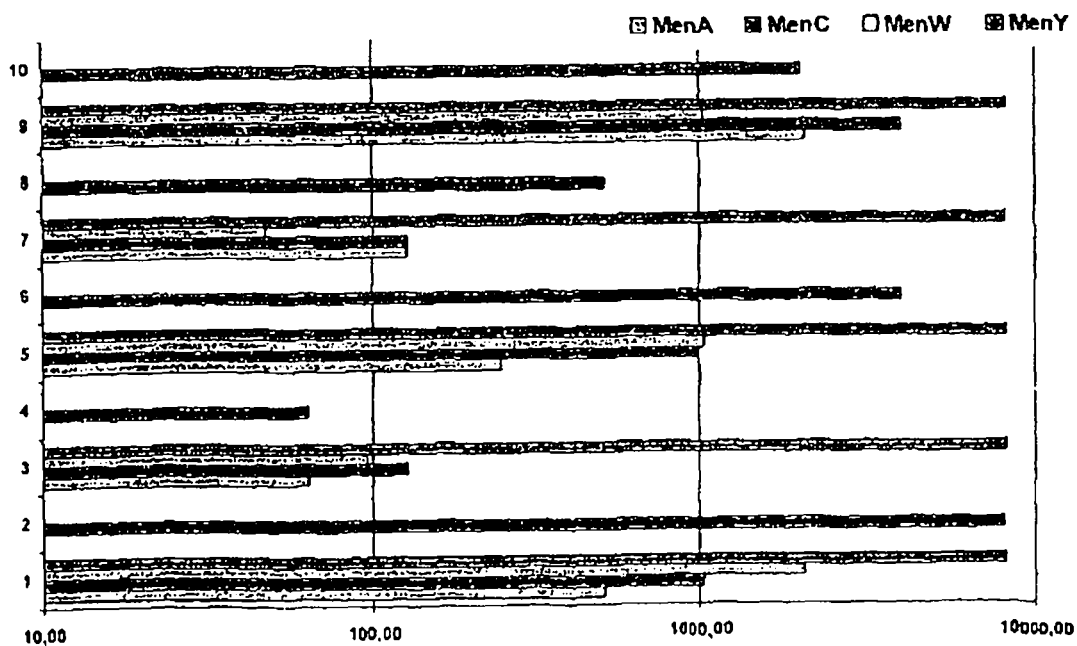


FIGURA 4A

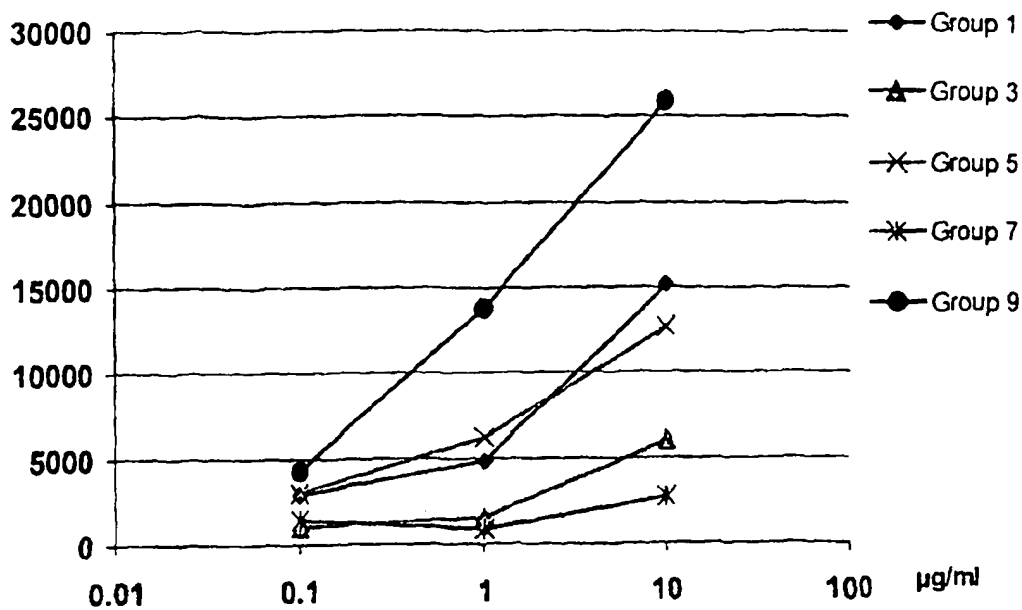


FIGURA 4B

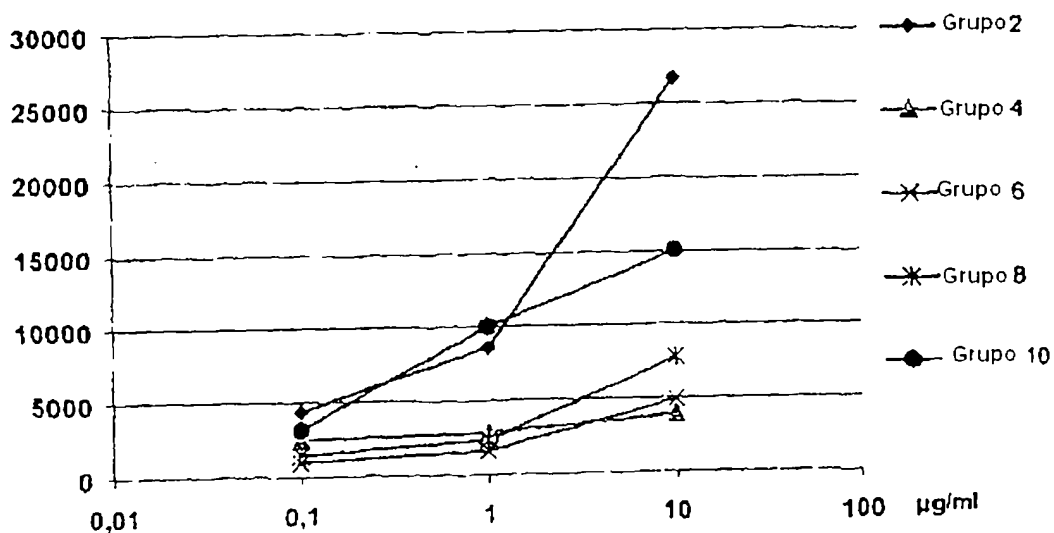


FIGURA 5

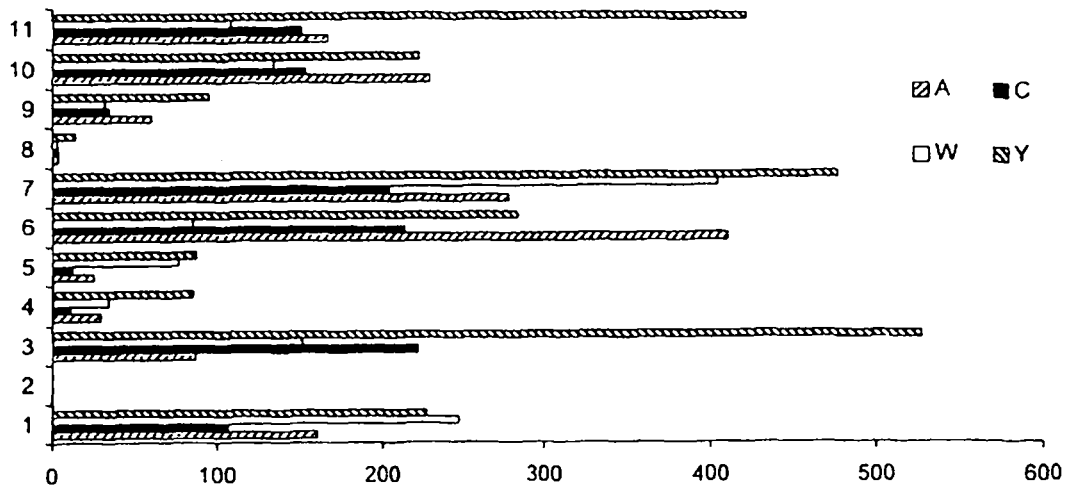


FIGURA 6

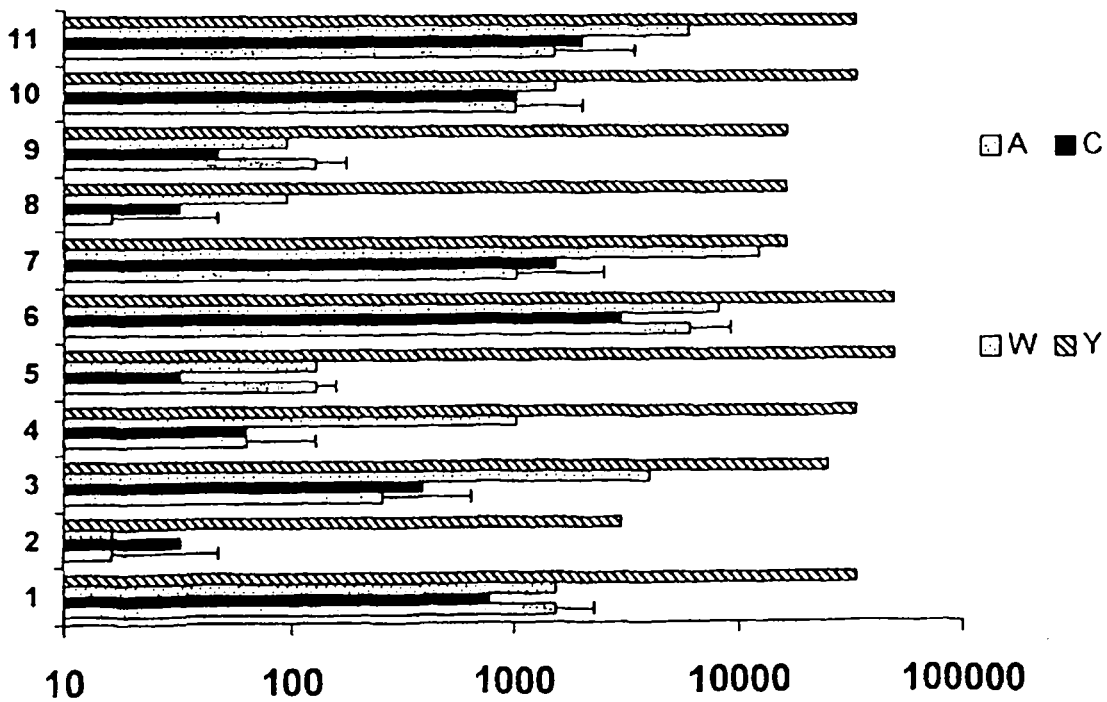


FIGURA 7A

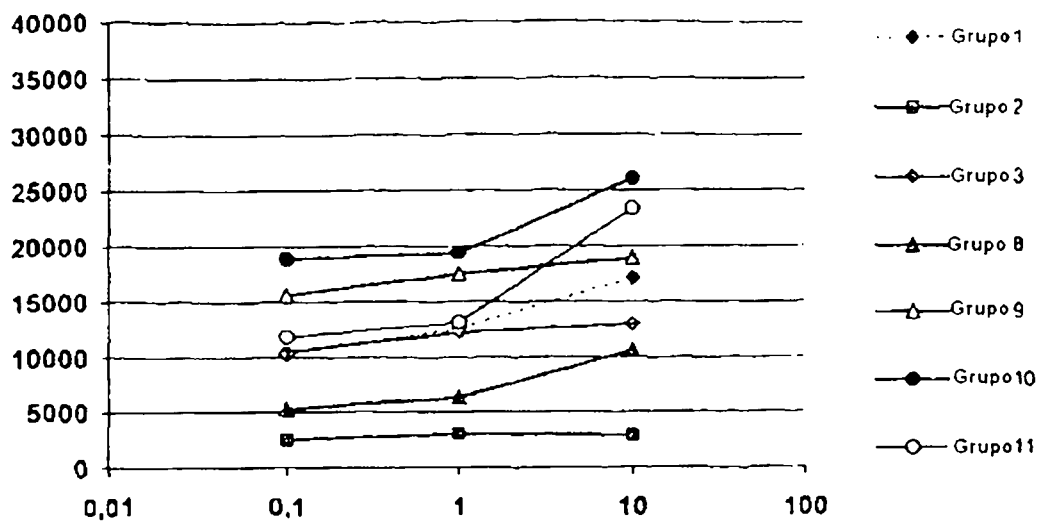


FIGURA 7B

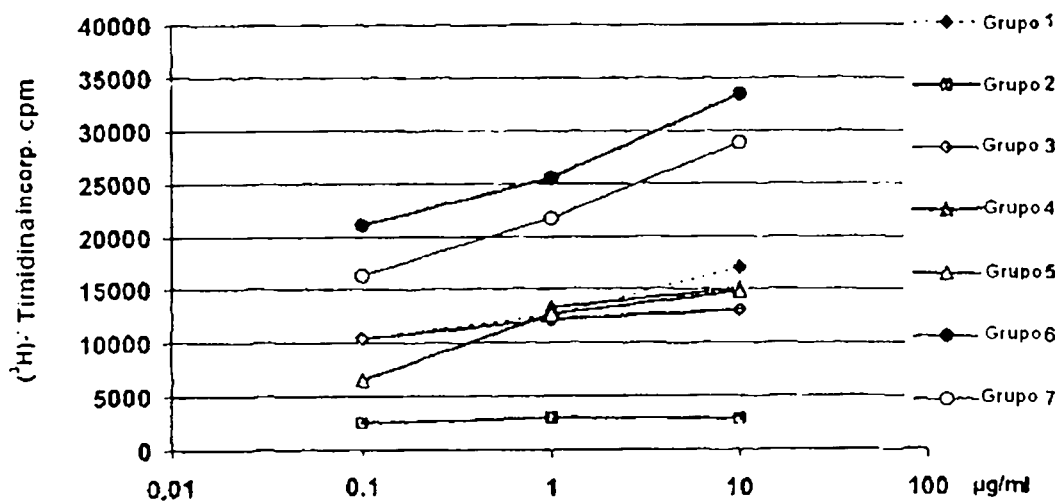


FIGURA 8

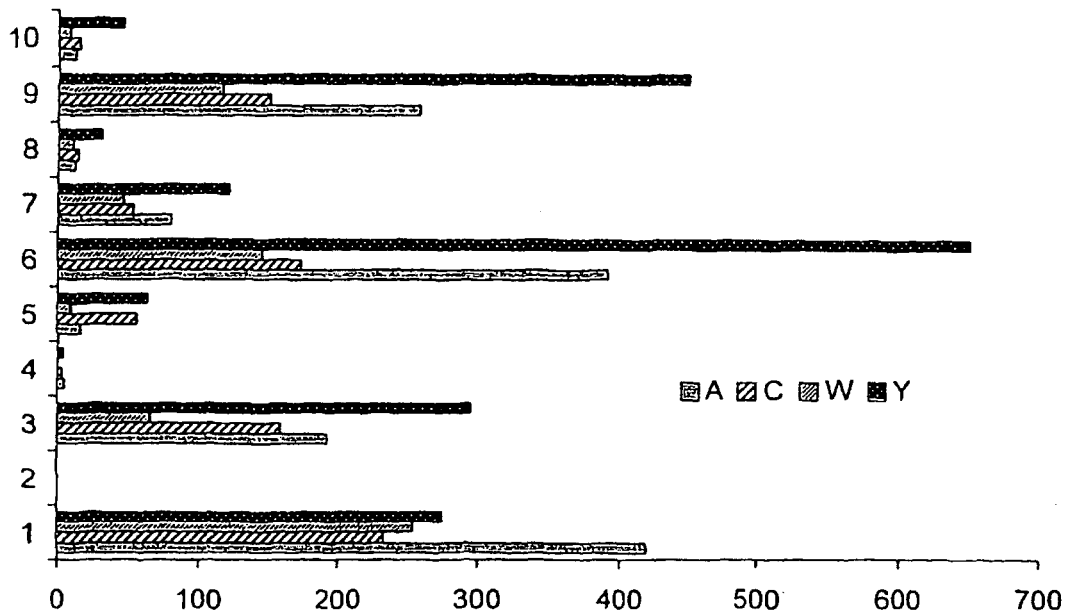


FIGURA 9

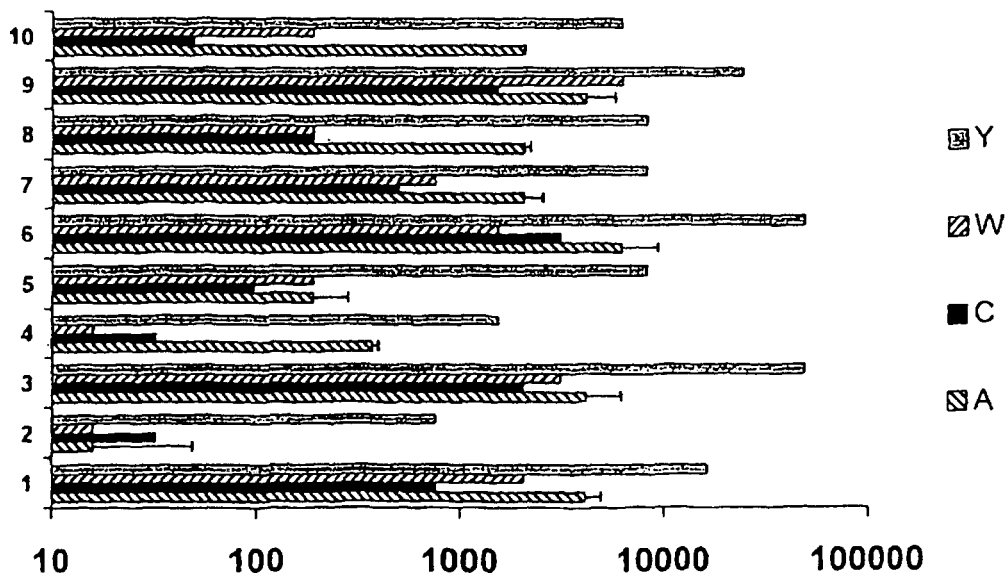


FIGURA 10 A

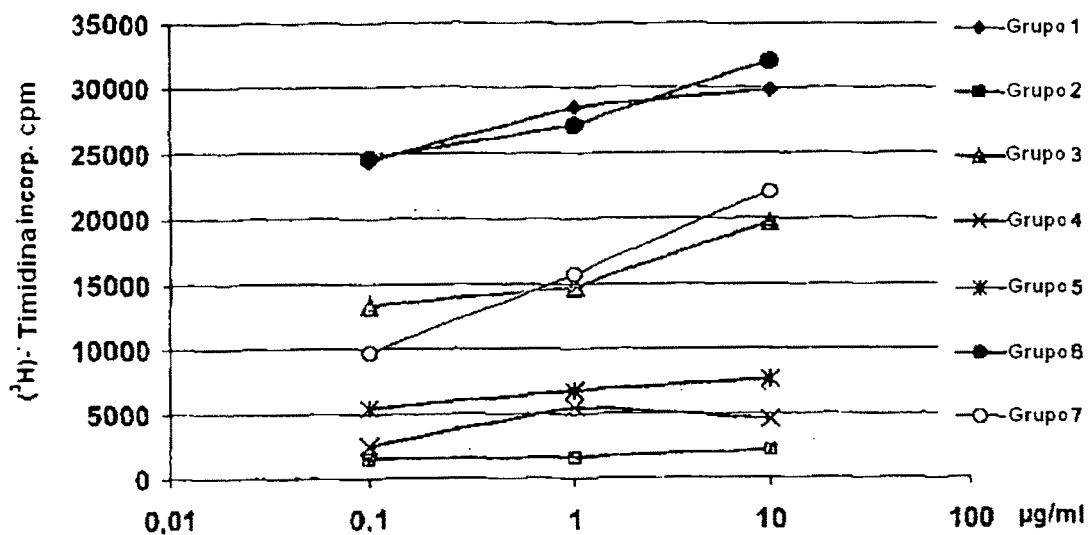


FIGURA 10 B

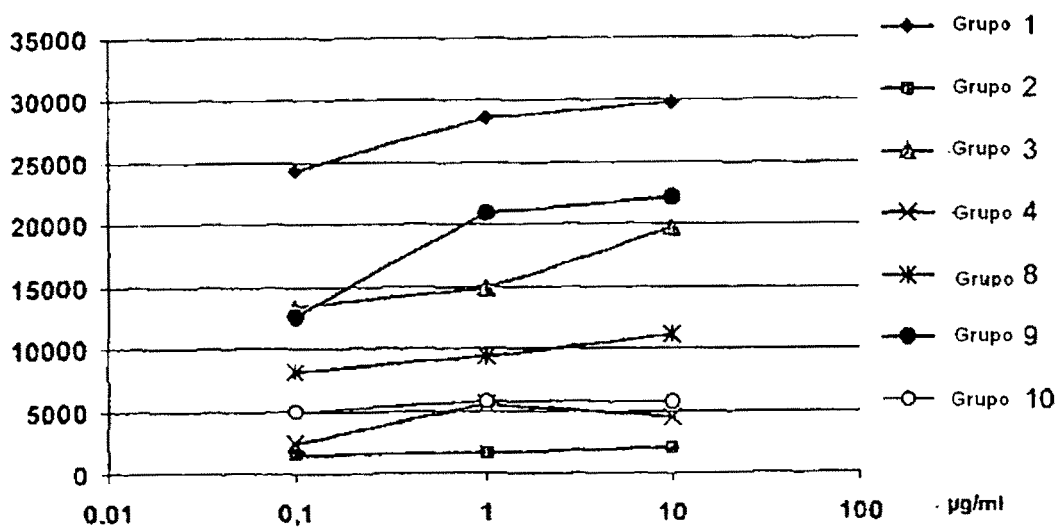


FIGURA 11

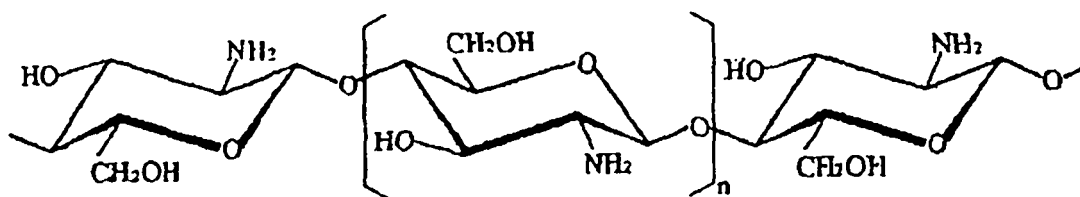


FIGURA 12

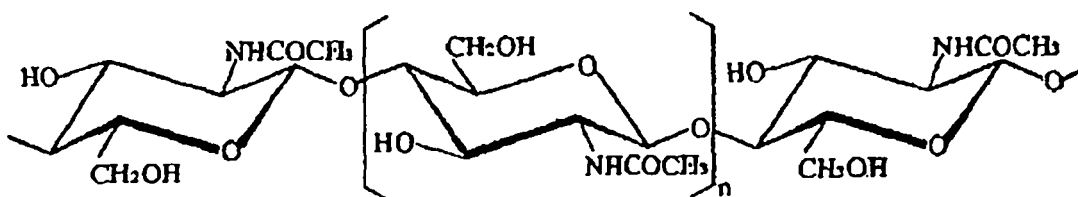


FIGURA 13

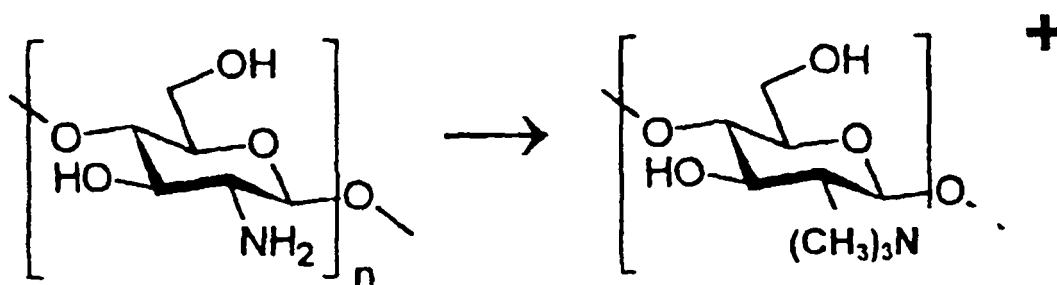


FIGURA 14A

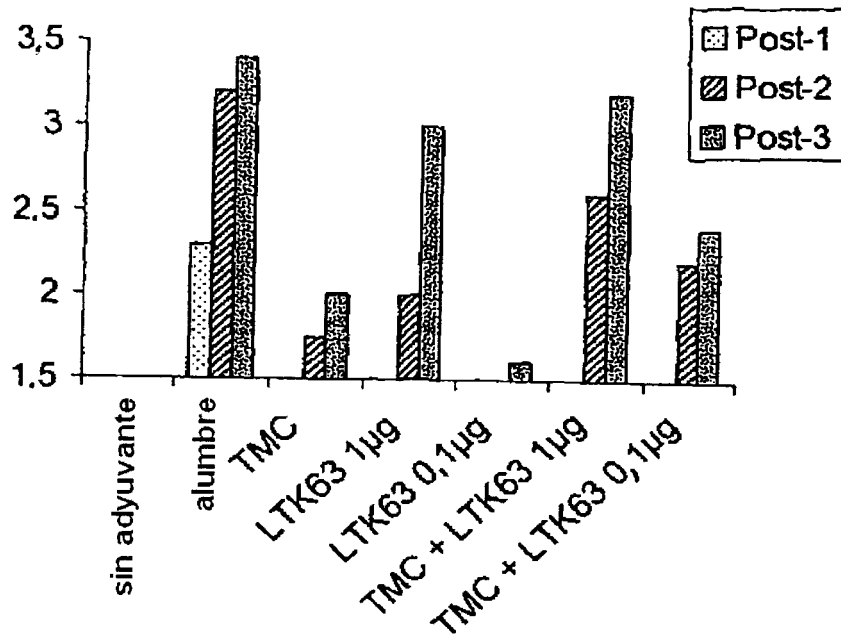


FIGURA 14B

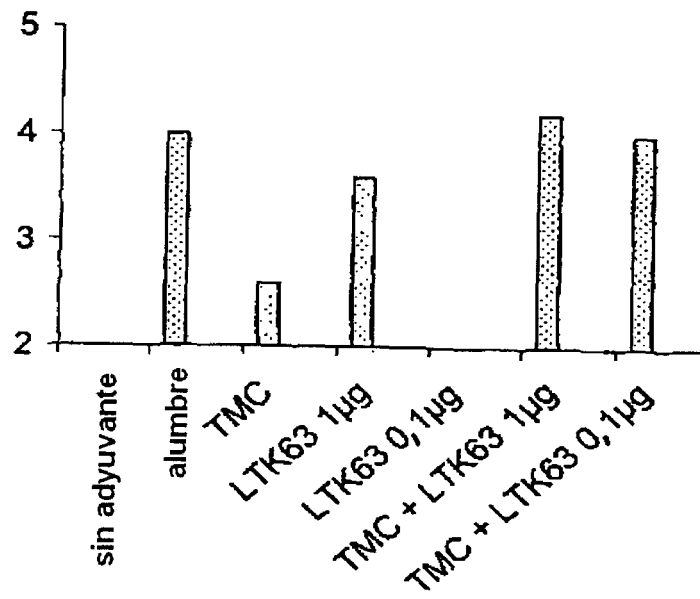


FIGURA 15 A

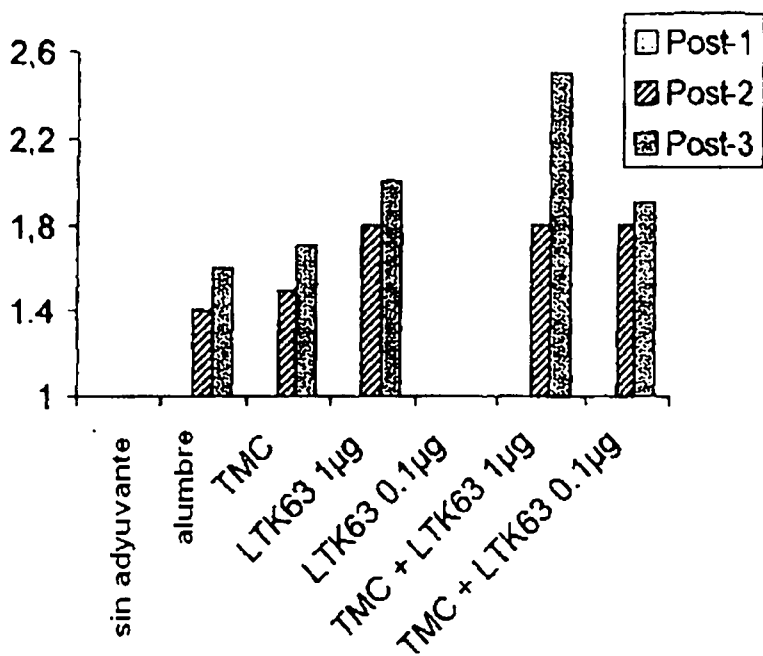


FIGURA 15 B

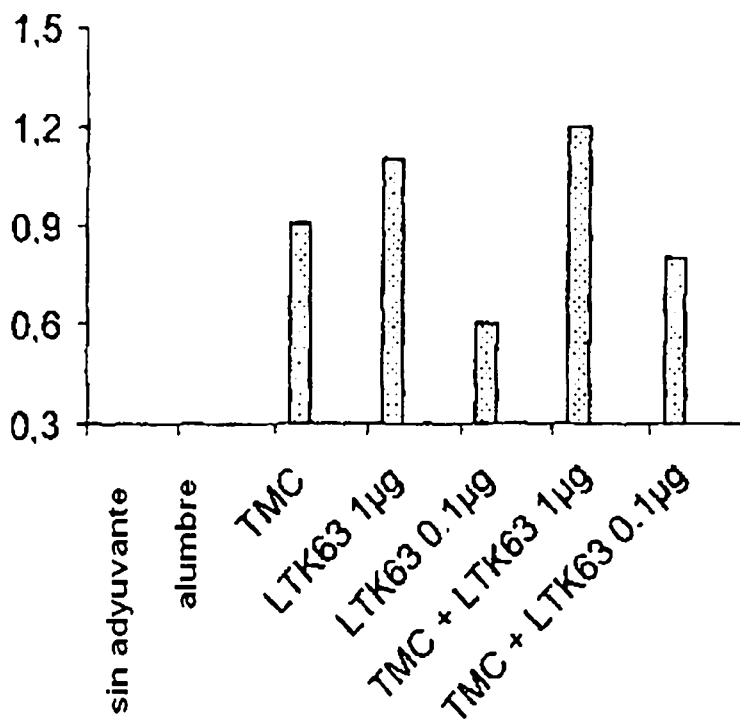


FIGURA 16

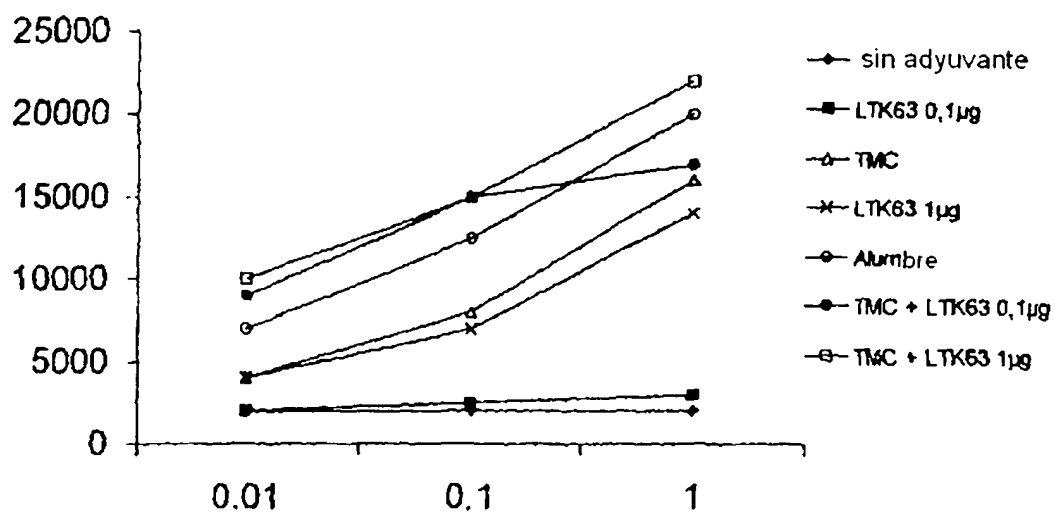


FIGURA 17

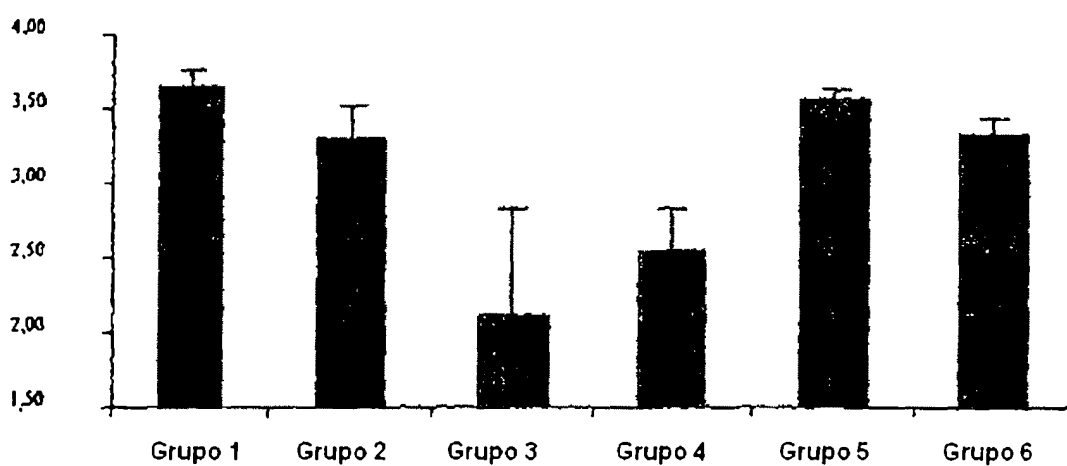


FIGURA 18

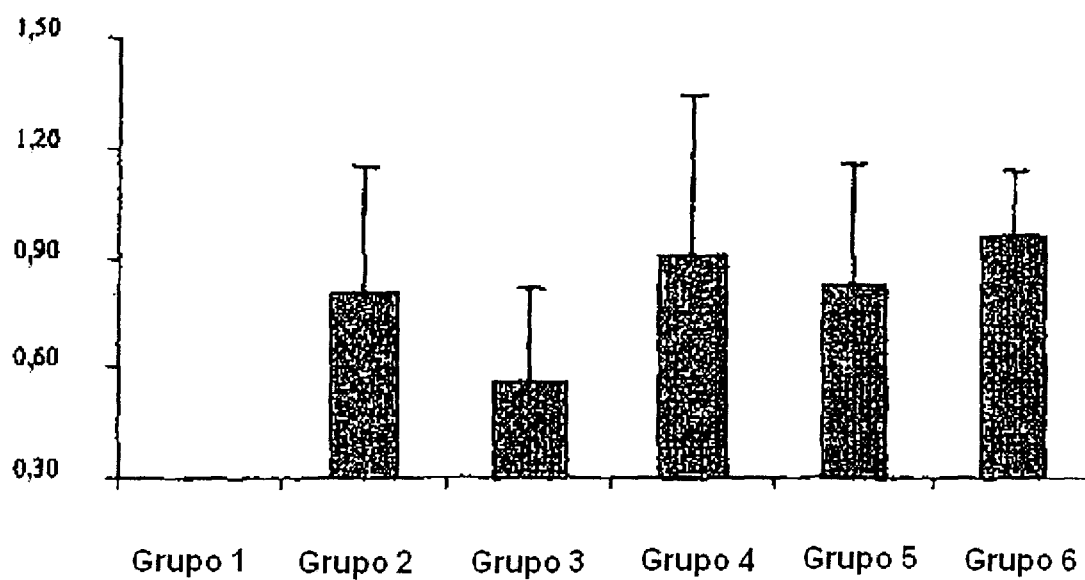


FIGURA 19

