

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 850 973**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/34 (2007.01)

A61K 47/44 (2007.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2011 E 17172800 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **10.04.2024 EP 3246044**

54 Título: **Formulaciones estables de antígenos rLP2086 de *Neisseria meningitidis***

30 Prioridad:

23.08.2010 US 376160 P

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

20.09.2024

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
66 Hudson Boulevard East
New York, NY 10001-2192, US**

72 Inventor/es:

**KHANDKE, LAKSHMI;
ARUMUGHAM, RASAPPA y
LOUN, BOUNTHON**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 850 973 T5

DESCRIPCIÓN

Formulaciones estables de antígenos rLP2086 de *Neisseria meningitidis*

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para estabilizar la potencia de un polipéptido LP2086 (fHBP) de la subfamilia B en una composición inmunogénica.

Antecedentes de la invención

rLP2086 es una lipoproteína recombinante de 28 kDa que induce anticuerpos bacterianos de reacción cruzada contra una serie de cepas de *Neisseria meningitidis*. En base a una homología de secuencia de aminoácidos deducida se identificaron dos subfamilias diferentes de rLP2086, A y B. Estas dos subfamilias se usaron en la formulación de las muestras de vacuna MnB-rLP2086 que contienen 20, 60, 120, y 200 µg/ml cada una de histidina 10 mM (pH 6,0), NaCl 150 mM y 0,5 mg/ml de aluminio con niveles variables de polisorbato 80 (PS-80). El polisorbato 80, también conocido como TWEEN 80, es un tensioactivo no iónico y emulsionante derivado de sorbitol y con frecuencia se usa en formulaciones farmacéuticas como emulsionante, solubilizante y estabilizante. Se cree que la presencia de polisorbato 80 en la composición inmunogénica MnB rLP2086 previene la agregación durante la formulación, procesamiento, filtración, carga y envío, reduce la absorción con filtro de membrana y reduce la absorción en tubos.

Sumario de la invención

La invención proporciona un procedimiento para estabilizar la potencia de un polipéptido LP2086 (fHBP) de la subfamilia B en una composición inmunogénica, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de (a) formular el polipéptido LP2086 (fHBP) de la subfamilia B en una composición que consiste esencialmente en aproximadamente una relación molar de 2,8:1 de polisorbato 80 a proteína, 0,5 mg/ml de aluminio como AlPO_4 , histidina 10 mM, pH 6,0 y NaCl 150 mM.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición inmunogénica estable, en la que la potencia de un polipéptido LP2086 de la subfamilia B se conserva durante al menos aproximadamente 1-12 meses, aproximadamente 6-18 meses, aproximadamente 12-24 meses, aproximadamente 24-36 meses o aproximadamente 36-48 meses.

La composición inmunogénica comprende un detergente. La proporción molar entre el detergente y la proteína es aproximadamente 2,8:1. En algunas realizaciones, la cantidad de detergente es suficiente para reducir la unión del polipéptido al silicio en un contenedor, tal como una jeringa o un vial. El detergente es polisorbato-80.

La composición inmunogénica comprende aluminio como fosfato de aluminio. La concentración de aluminio es de aproximadamente 0,5 mg/ml.

La composición inmunogénica comprende histidina y la concentración de histidina es de 10mM, pH 6,0.

En algunas realizaciones, la composición inmunogénica está liofilizada. En algunas realizaciones, la composición liofilizada se resuspende en un tampón que comprende aluminio. En algunas realizaciones, el aluminio está presente como fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, sulfato de aluminio o alumbre.

La composición inmunogénica consiste esencialmente en aproximadamente una proporción molar entre polisorbato 80 y la proteína de aproximadamente 2,8:1. 0,5 mg/ml de aluminio como AlPO_4 , histidina 10 mM a pH 6,0 y NaCl 150 mM. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende esencialmente 200µg/ml del polipéptido LP2086 (fHBP) de la subfamilia B, una proporción molar entre polisorbato 80 y la proteína de aproximadamente 2,8:1, 0,5 mg/ml de aluminio como AlPO_4 , histidina 10 mM a pH 6,0 y NaCl 150 mM.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Estabilidad de la subfamilia B en formulaciones con varias concentraciones de polisorbato 80.

Figura 2: Estabilidad acelerada de la subfamilia B con varias concentraciones de polisorbato 80.

Figura 3: Potencia de la subfamilia B a 200 µg/ml durante 28 días

Figura 4: Potencia de la subfamilia B a 20 µg/ml durante 28 días

Figura 5: Resultados de potencia para 200 µg/ml con diferentes proporciones molares

Figura 6: Resultados de potencia para 20 µg/ml con diferentes proporciones molares

Figura 7: Unión de la proteína al fosfato de aluminio a pH 6,5

Figura 8: Unión de MnB rLP2086 de la subfamilia A y B como una función del pH.

Figura 9: Efecto del pH, tampón y la concentración de proteínas sobre la unión de rLP2086 de la subfamilia A y B.

Figura 10: Aspecto visual de las formulaciones de rLP2086 sin fosfato de aluminio.

Figura 11: Mediciones de la DO de las muestras a 2-8°C.

Figura 12: Resultados de potencia para la subfamilia A para formulación con y sin AlPO_4 .

Figura 13: Resultados de potencia para la subfamilia B para formulación con y sin AlPO_4

Figura 14: Resultados de polisorbato 80 en rLP2086 Placebo con 0,5 mg/ml de aluminio

Figura 15: Resultados de Polisorbato 80 para la subfamilia A

Figura 16: Resultados de polisorbato 80 para la subfamilia B

Figura 17: Correlación entre la potencia y la proporción molar de unidos para la subfamilia B

Figura 18: Resultados de la proporción molar para la subfamilia A

5 Figura 19: Resultados de la proporción molar para la subfamilia B

Figura 20: Resultados de la proporción molar para formulaciones de rLP2086 a 400 µg/ml.

Figura 21: Resultados de polisorbato 80 para el producto farmacológico rLP2086 a diferentes puntos de tiempo.

Figura 22: Resultados de la proporción molar para el producto farmacológico rLP2086 a diferentes puntos de tiempo.

10 Figura 23: Resultados de la potencia y la proporción molar de unidos para la subfamilia A.

Figura 24: Resultados de la potencia y la proporción molar de unidos para la subfamilia B.

Figura 25: Unión de la subfamilia A con AlPO_4 en tampones de succinato y de histidina.

Figura 26: Unión de la subfamilia B con AlPO_4 en tampones de succinato y de histidina.

Figura 27: Comparación de la unión en tampones de succinato, histidina y fosfato.

15 Figura 28: Unión dependiente de pH de la subfamilia A con AlPO_4 .

Figura 29: Unión dependiente de pH de la subfamilia B con AlPO_4 .

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria descriptiva, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados.

A lo largo de esta memoria descriptiva, se entiende que la palabra "comprenden" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" implica la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, las formas del singular "un", "uno, una" y "el/la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, referencias al "procedimiento" incluye uno o más procedimientos y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que serán evidentes para el experto en la técnica tras la lectura de esta divulgación, y así sucesivamente.

Como se usa en el presente documento, las formas en plural incluyen referencias en singular, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, referencias a "los procedimientos" incluyen uno o más procedimientos y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que serán evidentes para el experto en la técnica tras la lectura de esta divulgación, y así sucesivamente.

Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" significa un intervalo estadísticamente significativo de un valor tal como un intervalo de concentración indicado, de un marco de tiempo, de peso molecular, de temperatura o de pH. Dicho intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, normalmente, dentro del 20 %, más normalmente todavía dentro del 10 % e incluso más normalmente dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. La variación permitida abarcada por el término "aproximadamente" dependerá del sistema en concreto en estudio y un experto en la técnica lo apreciará fácilmente. Siempre que se cite un intervalo en esta solicitud, cada número entero dentro del intervalo también se contempla como una realización de la invención.

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno, como se describe y pone de ejemplo más adelante en el presente documento. Ejemplos no limitantes de adyuvantes que se pueden usar en la vacuna de la presente invención incluyen el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alumbre, geles minerales tales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, tales como, por ejemplo, adyuvantes completos o incompletos de Freund, copolímero de bloque (CytRx, Atlanta Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A u otra fracción de saponina, monofosforil lípido A y adyuvante de lípido avridina-amina.

La expresión "unión del aluminio a proteína" se refiere al porcentaje de moléculas de proteína en una composición que se unen a aluminio. La unión del aluminio a la proteína se puede determinar usando procedimientos divulgados en el presente documento o conocidos en la técnica.

La expresión "cantidad inmunogénica eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un polipéptido o composición que comprende un polipéptido que es eficaz en la producción de una respuesta inmunitaria en un huésped vertebrado. Por ejemplo, una cantidad inmunogénica eficaz de una proteína rLP2086 de la presente invención es una cantidad que es eficaz en la producción de una respuesta inmunitaria en un huésped vertebrado. La "dosis o cantidad inmunogénica eficaz" concreta dependerá de la edad, el peso y el estado médico del huésped, así como del procedimiento de administración. Los expertos en la técnica determinarán fácilmente dosis adecuadas.

La expresión "proporción molar", como se usa en el presente documento, se refiere a la proporción del número de

moles de dos elementos diferentes en una composición. En algunas realizaciones, la proporción molar es la proporción de moles del detergente y moles de la proteína. En algunas realizaciones, la proporción molar es la proporción entre los moles de polisorbato y los moles de la proteína. En base a las concentraciones de proteína y de polisorbato 80, la proporción molar se calcula usando la ecuación siguiente:

$$\text{Proporción Molar} = \frac{\% \text{PS80}}{\text{mg/ml de proteína}} \times 216$$

Por ejemplo, una composición que comprende 0,01 % de polisorbato 80 y 200 µg tiene una proporción molar detergente:proteína de 10,8:1 [(0,01/0,2) x 216]. Una proporción de 3 moles de polisorbato 80 y 2 moles de proteína se expresaría como una proporción molar entre PS80 y proteína de 3:2. Además, su una proporción molar se cita como un número sencillo, se refiere a una proporción entre dicho número sencillo y 1. Por ejemplo, proporciones molares entre polisorbato y proteína de 0,5, 0,2 y 10 se refiere a proporciones de 0,5:1, 2:1 y 10:1, respectivamente. Como se usa en el presente documento, las expresiones proporción molar "detergente-proteína" y "polisorbato 80-proteína" se refieren, en general, a la proporción molar entre el detergente (o polisorbato 80) y los antígenos proteicos, particularmente los antígenos P2086. En función de las enseñanzas divulgadas en el presente documento, un experto en la técnica sería capaz de determinar cómo calcular proporciones molares para otros detergentes y la proporción molar óptima para formulaciones con otros detergentes. Como se usa en el presente documento, una proporción molar "baja" se refiere, en general, a una proporción molar entre el detergente y el antígeno proteico en la composición inmunogénica que es inferior a una proporción molar "alta". Una proporción molar "alta" se refiere, en general, a una proporción molar entre el detergente y el antígeno proteico en la composición inmunogénica que es superior a una proporción molar "baja". En algunas realizaciones, una "proporción molar alta" entre el detergente y la proteína se refiere a una proporción molar superior a 10:1. En algunas realizaciones, una "proporción molar baja" entre el detergente y la proteína se refiere a una proporción molar entre 0,5:1 y 10:1.

El término "ORF2086" como se usa en el presente documento, se refiere al marco de lectura abierto 2086 de una bacteria de la especie *Neisseria*. El ORF2086 de *Neisseria*, proteínas codificadas por el mismo, fragmentos de dichas proteínas y composiciones inmunogénicas que comprenden dichas proteínas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. nº US 20060257413 y US 20090202593. El término "P2086" se refiere, en general, a la proteína codificada por ORF2086. Las proteínas P2086 de la invención pueden ser lipidadas o no lipidadas. "LP2086" y "P2086" se refieren, normalmente, a formas lipidadas y no lipidadas de una proteína 2086, respectivamente. La proteína P2086 de la invención puede ser recombinante. "rLP2086" y "rP2086" se refieren, normalmente, a formas lipidadas y no lipidadas de una proteína 2086 recombinante, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" incluya todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración a seres humanos u otros huéspedes vertebrados. Normalmente, un transportador farmacéuticamente aceptable es un transportador autorizado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal, u otra agencia reguladora o indicada en la Farmacopea de EE.UU. o en otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, incluidos seres humanos, además de mamíferos no humanos. El término "transportador" refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, conservante y/o vehículo con el que se administra una composición farmacéutica. Dichos transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético. Como transportadores líquidos se pueden emplear agua, soluciones dalias y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede también contener cantidades minoritarias de agentes humectantes, de volumen, emulsionantes o tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, formulaciones de liberación sostenida y similares. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W.Martin. La formulación deberá adaptarse al modo de administración. El vehículo adecuado será evidente para los expertos en la técnica y dependerá en gran parte de la vía de administración.

El término "potencia" se refiere a la capacidad de un antígeno para producir una respuesta inmunogénica. En algunas realizaciones, la potencia se mide por la capacidad de un epítipo para unirse a un anticuerpo. La potencia se puede perder o reducir en el tiempo debido a la pérdida de antígeno o de la integridad del epítipo o un cambio en la conformación del antígeno o el epítipo. La potencia se puede perder o reducir debido a factores que incluyen, entre otros, la luz, la temperatura, los ciclos de congelación/descongelación, la agitación y el pH. La potencia se puede medir mediante los procedimientos divulgados en el presente documento y mediante ensayos conocidos en la técnica. Dichos ensayos de determinación de potencia incluyen, entre otros, modelos de vacunación animal, ensayos de

bactericidas en suero (EBS), citometría de flujo y ensayos de potencia in vitro. Los procedimientos preferidos para determinar la potencia son EBS y ensayos de potencia in vitro. Un procedimiento más preferido para determinar la potencia es el EBS. En algunas realizaciones, la potencia se puede determinar usando al menos un anticuerpo monoclonal dirigido contra al menos un epítipo implicado en la respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la potencia de una muestra de ensayo se compara con la potencia de un patrón de referencia. En algunas realizaciones, el patrón de referencia es la muestra de ensayo a T_0 . En algunas realizaciones, el patrón de referencia es una composición inmunogénica sin detergente. En algunas realizaciones, el patrón de referencia es una composición inmunogénica con una proporción molar detergente-proteína superior a 10:1.

Una respuesta inmunológica "protectora" se refiere a la capacidad de una composición inmunogénica para provocar una respuesta inmunológica, humoral o celular, que sirve para proteger al sujeto de una infección. La protección proporcionada no tiene que ser absoluta, es decir, no se tiene que prevenir o erradicar totalmente la infección, si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población control de sujetos, por ejemplo animales infectados a los que no se ha administrado la vacuna o la composición inmunogénica. La protección se puede limitar a mitigar la gravedad o la rapidez del inicio de los síntomas de la infección. En general, una "respuesta inmunitaria protectora" incluiría la inducción de un incremento de los niveles de anticuerpos específicos de un antígeno concreto en al menos el 50 % de los sujetos, incluido algún nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles a cada antígeno. En situaciones concretas, una "respuesta inmunitaria protectora" podría incluir la inducción de un incremento por dos de los niveles de anticuerpos o un incremento por cuatro de los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno concreto en al menos el 50 % de los sujetos, incluido algún nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles a cada antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos opsonizantes se correlacionan con una respuesta inmunitaria protectora. Por tanto, la respuesta inmunitaria protectora se puede analizar midiendo la disminución en porcentaje del recuento bacteriano en un ensayo de opsonofagocitosis, por ejemplo como lo descrito más adelante. En algunas realizaciones existe una disminución del recuento bacteriano de al menos 10 %, 25 %, 50 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más, en comparación con el recuento bacteriano en ausencia de la composición inmunogénica.

Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se refieren a un polímero de residuos de aminoácido y no están limitados a una longitud mínima del producto. Por tanto, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares están incluidos dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como fragmentos de las mismas están dentro de la definición. Los términos también incluyen modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservadora, pero que pueden ser no conservadoras), en una secuencia nativa, preferentemente tal que la proteína mantiene la capacidad de provocar una respuesta inmunológica dentro de un animal al que se administra la proteína. También se incluyen las modificaciones postexpresión, por ejemplo glicosilación, acetilación, lapidación, fosforilación y similares.

El término "recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína polipéptido o célula que expresa un gen de interés producido por procedimientos de ingeniería genética. El término "recombinante", como se usa con respecto a una proteína o polipéptido quiere decir un polipéptido producido mediante la expresión de un polinucleótido recombinante. Las proteínas de la presente invención se pueden aislar de una fuente natural o producirse mediante procedimientos de ingeniería genética. "Recombinante", como se usa en el presente documento, describe además una molécula de ácido nucleico que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociada con nada o una porción del polinucleótido con el que está asociada en la naturaleza. El término "recombinante", como se usa con respecto a una célula huésped quiere decir una célula huésped que incluye un polinucleótido recombinante.

Los términos "estable" y "estabilidad" se refieren a la capacidad de un antígeno para permanecer inmunogénico durante un periodo de tiempo. La estabilidad se puede medir en potencia en el tiempo. Los términos "estable" y "estabilidad" se refieren también a la estabilidad física, química y conformaciones de la composición inmunogénica. La inestabilidad de una composición proteica puede deberse a la degradación química o agregación de las moléculas proteicas para formar polímeros de orden superior, mediante disociación de los heterodímeros en monómeros, desglucosilación, modificación de la glucosilación o cualquier otra modificación estructural que reduzca al menos una actividad biológica de la composición proteica incluida en la presente invención. La estabilidad se puede evaluar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, que incluyen la medición de la dispersión de la luz en una muestra, la atenuación aparente de la luz (absorbancia o densidad óptica), el tamaño (p. ej., cromatografía de exclusión por tamaño), la actividad biológica in vitro o in vivo y/o propiedades mediante calorimetría diferencial de barrido (CDB). En la técnica se conocen otros procedimientos para evaluar la estabilidad y también se pueden usar de acuerdo con la presente invención.

En algunas realizaciones, un antígeno en una formulación estable de la invención puede mantener al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de potencia, en comparación con un patrón de referencia, durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, 36 meses, 42 meses, 48 meses, 54 meses o 60 meses. En algunas realizaciones, un antígeno en una formulación estable de la invención puede mantener al menos un 50 % de potencia, en comparación con un patrón de referencia, durante al menos 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o 5 años. Los términos "estable" y "estabilidad" también se refieren a la capacidad de un antígeno para mantener epítopos o inmunorreactividad durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, un antígeno en una formulación estable de la invención puede mantener al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %

de sus epítomos o inmunorreactividad, en comparación con un patrón de referencia, durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, 36 meses, 42 meses, 48 meses, 54 meses o 60 meses. En algunas realizaciones, la estabilidad se mide con respecto a una condición ambiental. Ejemplos no limitantes de condiciones ambientales incluyen la luz, la temperatura, los ciclos de congelación/descongelación, la agitación y el pH. Un experto en la técnica podría determinar la presencia de epítomos antigénicos o inmunorreactividad usando los procedimientos divulgados en el presente documento u otros procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, McNeil y col. *Vaccine*, 27: 3417-3421 (2009). En algunas realizaciones, la estabilidad de un antígeno se mide desde la fecha de su formulación. En algunas realizaciones, la estabilidad de un antígeno se mide desde la fecha de un cambio en sus condiciones de almacenamiento. Ejemplos no limitantes de cambios en las condiciones de almacenamiento incluyen cambios de congelado a refrigerado, cambios de congelado a temperatura ambiente, cambios de refrigerado a temperatura ambiente, cambios de refrigerado a congelado, cambios de temperatura ambiente a congelado, cambios de temperatura ambiente a refrigerado, cambios de luz a oscuridad o introducción de agitación.

El término "estabilizante" se refiere a un compuesto que se une a un antígeno y mantiene los epítomos o inmunorreactividad del antígeno durante un periodo de tiempo. Los estabilizantes se conocen en la técnica. Ejemplos de estabilizantes incluyen cationes multivalentes, por ejemplo de calcio o aluminio.

El término "sujeto" se refiere a un mamífero, ave, pez, reptil o cualquier otro animal. El término "sujeto" también incluye seres humanos. El término "sujeto" también incluye mascotas domésticas. Ejemplos no limitantes de mascotas domésticas incluyen: Perros, gatos, cerdos, conejos, ratas, ratones, jerbos, hámster, cobayas, hurones, aves, serpientes, lagartijas, peces, tortugas y ranas. El término "sujeto" también incluye animales de ganado. Ejemplos no limitantes de animales de ganado incluyen: alpacas, bisontes, camellos, ganado vacuno, ciervos, cerdos, caballos, llamas, mulas, burros, ovejas, cabras, conejos, renos, yak, pollos, gansos y pavos.

Los términos "vacuna" o "composición de vacuna", que se usan de forma intercambiable, se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una composición inmunogénica que induce una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Descripción general

La presente invención surge del nuevo descubrimiento de que los antígenos rLP2086 de la subfamilia B, pero no los antígenos rLP2086 de la subfamilia A, pierden potencia en el tiempo en una formulación de vacuna bivalente y, por tanto, son inestables. Variando los componentes de la formulación bivalente se determinó que proporciones molares altas entre detergente y proteína en la formulación de vacuna bivalente tenía como resultado inestabilidad específica del antígeno rLP2086 de la subfamilia B. Reduciendo la proporción molar entre detergente y proteína en las formulaciones bivalentes y monovalentes se tuvo como resultado un incremento de la estabilidad, determinado por el mantenimiento de la potencia en el tiempo, del antígeno rLP2086 de la subfamilia B sin afectar a la estabilidad del antígeno rLP2086 de la subfamilia A. Este resultado es sorprendente porque las lipoproteínas normalmente se purifican y almacenan usando concentraciones de detergente altas para prevenir la agregación de sus restos lipídicos hidrófobos.

En estudios adicionales se reveló que las formulaciones de proporción molar baja tenían como resultado la agregación de los antígenos rLP2086 de las subfamilias A y B tras agitación de las composiciones inmunogénicas de proporción molar baja. No obstante, el incremento de la concentración de aluminio en las composiciones de proporción molar baja previno la agregación de los antígenos rLP2086 de las subfamilias A y B, incluso con agitación. Además, los antígenos rLP2086 de la subfamilias A son más sensibles a los efectos de las proporciones molares del detergente bajas en ausencia de aluminio.

Composiciones inmunogénicas

En la técnica se conocen composiciones inmunogénicas que incluyen una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos del ORF2086 de *Neisseria meningitidis*. Ejemplos de composiciones inmunogénicas incluyen las descritas en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. nº US 20060257413 y US 20090202593. Dichas composiciones inmunogénicas descritas en ellas incluyen una proteína que exhibe actividad bactericida identificada como proteína ORF2086, porciones inmunogénicas de la misma y/o equivalentes biológicos de la misma. La proteína ORF2086 se refiere a una proteína codificada por el marco de lectura abierto 2086 de especies de *Neisseria*.

La proteína puede ser una proteína recombinante o una proteína aislada de especies de *Neisseria* nativas. Por ejemplo, las proteínas ORF2086 de *Neisseria* se pueden aislar de cepas bacterianas, tales como de las especies de *Neisseria*, incluidas las cepas de *Neisseria meningitidis* (serogrupos A, B, C, D, W-135, X, Y, Z y 29E), *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria lactamica*, así como porciones inmunogénicas y/o equivalentes biológicos de dichas proteínas.

Las proteínas ORF2086 incluyen las proteínas 2086 de la subfamilia A y las proteínas de la subfamilia B, porciones inmunogénicas de las mismas y/o equivalentes biológicos de las mismas. Las proteínas ORF2086 o equivalentes de las mismas pueden estar lipidadas o no lipidadas. Preferentemente, la proteína ORF2086 de *Neisseria* está lipidad.

En una realización, la composición inmunogénica incluye una proteína aislada que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 95 % con una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos de ORF2086 de *Neisseria*.

5 En otra realización, la composición inmunogénica incluye una proteína aislada que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 95 % con una proteína de la subfamilia B codificada por una secuencia de nucleótidos de ORF2086 de *Neisseria*. Preferentemente, la composición inmunogénica incluye una proteína aislada de la subfamilia B codificada por una secuencia de nucleótidos de ORF2086 de *Neisseria*. En algunas realizaciones, la proteína ORF2086 de la subfamilia B es una variante B01.

10 La presente invención también contempla regímenes multi-inmunización en los que cualquier composición útil contra un patógeno se puede combinar en o con las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, sin limitaciones, se puede administrar a un paciente la composición inmunogénica de la presente invención y otra composición inmunológica para inmunizar contra el papilomavirus humano (PVH), tal como la vacuna contra el PVH GARDASIL®, como parte de una régimen de multi-inmunización. Los expertos en la técnica podrán seleccionar fácilmente composiciones inmunogénicas para usar junto con las composiciones inmunogénicas de la presente invención para
15 los fines de desarrollar e implementar regímenes de multi-inmunización.

Las composiciones inmunogénicas de la invención incluyen, preferentemente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, cargas, vehículos sólidos, soluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares. Transportadores farmacéuticamente
20 aceptables incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos.

Vehículos farmacéuticamente aceptables pueden también incluir cantidades minoritarias de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida de almacenamiento o la eficacia del anticuerpo. La preparación y uso de los vehículos farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica. Excepto cuando alguno de los medios o agentes convencional sea incompatible con el principio, se contempla el uso de los mismos en las composiciones inmunogénicas de la presente invención.
25

Las composiciones inmunogénicas se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo mediante inyección, bien subcutánea o intramuscular, además de por vía oral o intranasal. Procedimientos para inmunización intramuscular se describen en Wolff y col. *Biotechniques*;11(4):474-85, (1991). y por Sedegah y col. *PNAS* Vol. 91, pp. 9866-9870, (1994). Otros modos de administración emplean formulaciones orales, formulaciones pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas, por ejemplo, sin limitaciones. Por ejemplo, las formulaciones orales incluyen dichos excipientes empleados habitualmente, por ejemplo calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares, sin limitaciones. Preferentemente, la composición inmunogénica se administra por vía intramuscular.
30

35 Se ha usado fosfato de aluminio como adyuvante en un ensayo clínico de fase I hasta una concentración de 0,125 mg/dosis, mucho menor que el límite de 0,85 mg/ dosis especificada por el Código de Reglamentos Federales de EE.UU. [610(a)]. Los adyuvantes que contienen aluminio son muy usados en seres humanos para potenciar la respuesta inmunológica de antígenos cuando se administran por vía intramuscular o subcutánea.

40 Una cantidad (es decir, dosis) de composición inmunógena que se administra al paciente se puede determinar de acuerdo con técnicas estándar conocidas para los expertos en la técnica, teniendo en cuenta factores tales como el antígeno concreto, el adyuvante (si está presente), la edad, el sexo, el peso, la especie, el estado del paciente concreto y la vía de administración.

Por ejemplo, una dosis para un paciente adolescente humano puede incluir al menos 0,1, 1µg, 1 µg, 10 µg o 50 µg de una proteína ORF2086 de *Neisseria* y como máximo 80 µg, 100 µg, 150 µg, o 200 µg de una proteína ORF2086 de *Neisseria*. Cualquier valor mínimo y cualquier valor máximo se pueden combinar para definir un intervalo adecuado.
45

Ensayos de potencia in vitro

La potencia se determina mediante cuantificación de los epítomos funcionales en las proteínas de la subfamilia A y la subfamilia B en una composición inmunogénica usando anticuerpos monoclonales específicos de conformación contra un material de referencia rLP2086. La potencia se determina mediante medida cuantitativa de los epítomos funcionales en las proteínas rLP2086 de la subfamilia A y la subfamilia B que provocarán una respuesta inmunitaria in vivo para generar anticuerpos bactericidas. La tecnología cuantitativa se usa para el ensayo de potencia con determinados anticuerpos monoclonales (AcMo). Para cada subfamilia de proteína rLP2086 en las composiciones inmunogénicas se seleccionan dos anticuerpos monoclonales funcionales conformacionales y no solapantes. Entre los dos anticuerpos monoclonales purificados, el primer anticuerpo se conjuga con un primer marcador, en el que el primer
50 marcador se usa para capturar la molécula proteica rLP2086. En algunas realizaciones, el primer marcador es biotina, glutatión-S-transferasa (GST), un marcador de 6 His o perlas (p. ej., perlas de poliestireno carboxiladas o perlas paramagnéticas). En algunas realizaciones, el primer marcador se captura con perlas de estreptavidina, una columna de estreptavidina, perlas de níquel, una columna de níquel, centrifugación o con un campo magnético. El segundo

anticuerpo se conjuga con un segundo marcador, en el que el segundo marcador es cuantificable. En algunas realizaciones, el segundo marcador es biotina, peroxidasa de rábano (HRP), un fluoróforo o un radiomarcador. En algunas realizaciones, el segundo marcador se detecta con estreptavidina conjugada con un fluoróforo o HRP, mediante electroquimioluminiscencia, detección de fluorescencia o detección de radioactividad. Solo se medirán las proteínas que exhiben ambos epítomos reconocidos por los dos AcMo en cada composición inmunogénica. Se reflejarán los cambios en uno cualquiera o ambos epítomos de la proteína. La potencia de la muestra se comunica con respecto a la potencia del material de referencia.

La divulgación abarca un procedimiento para determinar la potencia de una proteína 2086. El procedimiento comprende las etapas de: (1) incubar un primer Ac monoclonal y un segundo AcMo con una composición inmunogénica que comprende una proteína 2086, en el que el primer AcMo se conjuga con un primer marcador que se usa para capturar el AcMo y el segundo AcMo se conjuga con un segundo marcador que es detectable y en el que los AcMo primero y segundo están dirigidos a diferentes epítomos conformacionales sobre una proteína 2086 de referencia; (2) capturar el primer AcMo unido a la proteína 2086 usando el primer marcador; y (3) detectar y cuantificar la cantidad de segundo AcMo unido a la proteína 2086 usando el segundo marcador. En algunas realizaciones, la proteína 2086 es una proteína de la subfamilia B. En algunas realizaciones, la proteína 2086 está lipídada. En algunas realizaciones, la proteína es recombinante. En algunas realizaciones, el primer marcador es biotina, un marcador de 6 His o perlas (p. ej., perlas de poliestireno carboxiladas o perlas paramagnéticas). En algunas realizaciones, el primer marcador se captura con perlas de estreptavidina, una columna de estreptavidina, perlas de glutatión, perlas de níquel, una columna de níquel, centrifugación o con un campo magnético. En algunas realizaciones, el segundo marcador es biotina, HRP, un fluoróforo o un radiomarcador. En algunas realizaciones, el segundo marcador se detecta con estreptavidina conjugada con un fluoróforo o HRP, mediante electroquimioluminiscencia, detección de fluorescencia o detección de radioactividad.

Estabilidad de la potencia del antígeno rLP2086 de la subfamilia B

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición inmunogénica para estabilizar antígenos rLP2086 de la subfamilia B en el tiempo, que comprende un tampón con una proporción molar detergente-proteína baja.

En algunas realizaciones, hay al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de unión de aluminio a la proteína.

En algunas realizaciones, la formulación de la composición inmunogénica del antígeno proteico MnB rLP2086 de la subfamilia B es solución salina tamponada con histidina 10 mM, a pH 6,0, que contiene 0,5 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio y una proporción polisorbato 80-proteína de 2,8.

En algunas realizaciones, hay al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de unión de aluminio a la proteína.

En algunas realizaciones, el tampón en el que se almacena el antígeno proteico MnB rLP2086 de la subfamilia B es solución salina tamponada con histidina 10 mM, a pH 6,0, que contiene 0,5 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio y una proporción polisorbato 80-proteína de 2,8.

Con el fin de que esta invención se entienda mejor, se exponen los ejemplos siguientes. Los ejemplos son con fines ilustrativos únicamente y no deben interpretarse como limitantes del ámbito de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Procedimientos experimentales

Determinación de la unión a aluminio

Una composición que comprende aluminio y al menos un antígeno proteico se centrifugó de modo que sedimentó el aluminio. La centrifugación de las proteínas adsorbidas en aluminio se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Egan y col., Vaccine, Vol. 27(24):3175-3180 (2009). La proteína unida a aluminio también sedimentó, mientras que la proteína no unida a aluminio permaneció en el sobrenadante. La proteína total en el sobrenadante y en el sedimento se determinó mediante el ensayo de Lowry. El porcentaje de proteína unida se calculó dividiendo la proteína total en el sobrenadante por la proteína total añadida a la composición, y multiplicando por 100 %. De forma similar, el porcentaje de proteína no unida se calculó dividiendo la proteína total en el sobrenadante por la proteína total añadida a la composición, y multiplicando por 100 %.

Para las composiciones que comprenden antígenos de las dos subfamilias, A y B, las concentraciones individuales de proteína de las subfamilias A y B en el sobrenadante se determinaron mediante cromatografía de intercambio iónico. La separación y la elución de las proteínas de las subfamilias A y B se llevaron a cabo usando una columna de aniones fuertes y un eluyente de concentración alta de sales. Las proteínas de las dos subfamilias A y B se detectaron y cuantificaron usando un equipo detector de fluorescencia a Excitación= 280 por ciclo y Emisión = 310 por ciclo. Las proteínas de la subfamilia A y de la subfamilia B eluyen a distintos tiempos de retención y se cuantificaron usando una curva estándar generada contra un material de referencia proteico B rLP2086. El porcentaje de proteína no unida se

calculó dividiendo la proteína total en el sobrenadante por la proteína total añadida a la composición, y multiplicando por 100 %. El porcentaje de proteína unida se calculó restando el porcentaje de proteína no unida del 100 %.

Ensayo de potencia in vitro

El ensayo de potencia de rLP2086 es un ensayo de captura homogénea o ensayo de tipo sándwich que depende de dos anticuerpos monoclonales funcionales que reconocen epítomos conformacionales y no solapantes sobre una molécula proteica sencilla de la sustancia farmacológica rLP2086. Un anticuerpo monoclonal purificado sirve como anticuerpo de captura (AcMo) y está químicamente conjugado a perlas de poliestireno carboxiladas que tienen un identificador único codificado por colores. El segundo anticuerpo está biotinilado y sirve como anticuerpo de detección que se une posteriormente a estreptavidina conjugada con el fluoróforo R-ficoeritrina (SA-PE). Las características de fluido de un instrumento de detección Bio-Plex cuantifican microesferas individuales y su señal SA-PE asociada. Una señal de fluorescencia de R-ficoeritrina asociada con la microesfera solo se detectará mediante la formación de un complejo ternario entre el anticuerpo conjugado con la perla, el antígeno y el anticuerpo de detección, y será proporcional al número funcional de epítomos en las muestras rLP2086. Un cambio en uno o ambos epítomos que tiene como resultado una pérdida de fluorescencia con respecto al patrón de referencia indicará una pérdida de potencia.

Reactivos

- Microesferas conjugadas con anticuerpo monoclonal (conjugado a la región 12 de la esfera o a la región 66 de la esfera de Luminex MicroPlex Microsphere)
- Anticuerpo monoclonal biotinilado.
- Materiales de referencia rLP2086, subfamilias A y B, 2 mg/ml. Almacenar a 70 °C
- rLP2086 Subfamilia A y B, catión bivalente
- Estreptavidina, conjugado con R-ficoeritrina, liofilizado

Tampones

- Histidina 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0
- Polisorbato 80 al 5 % p/v (PS-80) en solución salina al 0,85 % p/v.
- Tampón de la matriz (Histidina 10 mM, polisorbato 80 al 0,02 %, NaCl 150 mM, pH 6,0).
- Tampón de ensayo (PBS, pH 7,4 con BSA al 0,1 %, polisorbato 80 al 0,02 %, azida al 0,1 %).
- 100x Estreptavidina, conjugado con R-ficoeritrina(SA-PE) – Vial abierto de estreptavidina, R-ficoeritrina liofilizada, y añadida 1 ml de agua destilada. Se agita hasta su disolución completa.

Procedimiento

A 600 µl del tampón de la matriz se añadieron 200 µl de la proteína de la subfamilia A y 200 µl de la proteína de la subfamilia B, hasta una concentración de 400 µg/ml de cada subfamilia. Se generó una curva estándar de ocho concentraciones (3333-1,5 ng/ml) mediante dilución de la solución madre en tampón de ensayo.

A 800 µl del tampón de la matriz se añadieron 200 µl del control bivalente, hasta una concentración de 400 µg/ml de cada subfamilia. La solución madre de 400 µg/ml para fabricar concentraciones de trabajo de 100, 50 y 12,5 ng/ml se diluyó en tampón de ensayo. Las concentraciones de 100 y 12,5 ng/ml representaron los controles alto y bajo (CH) y (CL), respectivamente.

Las muestras de ensayo se diluyeron en tampón de matriz hasta una concentración de 400 µg/ml. Se prepararon soluciones de trabajo de 100, 50 y 12,5 ng/ml a partir de la solución madre de 400 µg/ml.

Se preparó una mezcla de ensayo homogénea usando una concentración de perlas conjugadas de 2×10^5 perlas/ml y una concentración del anticuerpo de detección de 30 µg/ml en un tampón de ensayo. Se preparó una placa muestra mediante la adición de 0,4 ml de estándar, un control, muestra o blanco a una placa de 96 pocillos hondos de 2 ml. Los filtros de una placa de filtros MultiScreen_{HTS}-BV de 6 pocillos se prehumidificaron mediante la adición de 100 µl de tampón de ensayo, que después se pasó por el filtro mediante succión al vacío. A la placa de 96 pocillos se añadieron 25 µl de la mezcla de ensayo homogénea preparada. A cada pocillo de la placa de filtros de 96 pocillos se añadieron 25 µl de cada solución estándar, control, muestra o blanco. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con agitación.

Tras la incubación con antígeno-anticuerpo el tampón se retiró mediante aspiración al vacío a través del filtro. El filtro de cada pocillo se lavó tres veces con 100 µl de tampón de ensayo, seguido de aspiración al vacío. Después del lavado final, a cada pocillo se añadieron 50 µl de 1x SA-PE. La placa se incubó 10 minutos a temperatura ambiente con agitación en un título en oscuridad.

Tras la incubación con SA-PE, a cada pocillo se añadieron 75 µl del tampón de ensayo para un volumen total de 125 µl. La placa se leyó inmediatamente en un sistema Bio-Plex 200 System.

Ensayo de bactericida en suero

Conejos hembra New Zealand White de 2,5-3,0 kg, obtenidos de Charles River Canada (St. Constant, QC, Canadá), se sometieron a detección selectiva mediante ELISA de sangre entera para identificar los que tenían baja reactividad contra dos cepas diferentes de meningococos (una de cada subfamilia de P2086). En general, los conejos tenían antecedentes de reactividad muy baja, por lo que se seleccionaron aquéllos con los valores menores. Se vacunó a los conejos por vía intramuscular las semanas 0, 4 y 9, con rLP2086-A05 monovalente, rLP2086-B01 monovalente o con una vacuna rLP2086-A05 + B01 bivalente. Cada dosis contenía 100 µg de proteína para las vacunas monovalentes y 100 µg de cada proteína para la vacuna bivalente, formuladas en tampón de histidina 10 mM a pH 6,0, NaCl 150 mM, polisorbato 80 al 0,02 % y 250 µg de AlPO_4 . La vacuna se inyectó por vía intramuscular en la pata trasera derecha (0,5 ml/dosis). Como control, se vacunó a un grupo de conejos con el tampón de formulación solo. Se obtuvieron muestras de suero para análisis antes de la inmunización (semana 0) y después de la inmunización (semana 10). Todos los protocolos con animales cumplieron las guías establecidas por el Comité Institucional de Uso y Cuidados de Animales.

Los anticuerpos bactericidas en el suero de los conejos inmunizados con la vacuna con rLP2086 se determinaron usando EBS con complemento humano. Los sueros de conejo inmune se inactivaron con calor para eliminar la actividad del complemento intrínseca y, después, se diluyó en serie a 1:2 en PBS de Dulbecco con Ca^{2+} y Mg^{2+} (D-PBS) en una placa de microtitulación de 96 pocillos para analizar la actividad bactericida en suero contra cepas de *N. meningitidis*. Las bacterias usadas en el ensayo se cultivaron en medio GC suplementado con suplemento de Kelloggs (GCK) y se controló mediante densidad óptica a 650 nm. Se recolectaron bacterias para usar en el ensayo final a una DO_{650} de 0,50-0,55, se diluyeron en D-PBS y se añadieron 1000-3000 UFC en la mezcla de ensayo con 20 % de complemento humano.

Como fuente de complemento exógena se usó suero humano sin actividad bactericida detectable. Las fuentes del complemento se analizaron para determinar su idoneidad contra cada cepa de ensayo individual. Una fuente de complemento solo se usó si el número de bacterias supervivientes en controles sin suero inmunitario añadido era > 75 %. Para realizar los EBS descritos en este estudio se necesitaron diez fuentes de complemento únicas.

Tras una incubación de 30 minutos a 37°C con CO_2 al 5 %, se añadió D-PBS a la mezcla de reacción y se transfirieron alícuotas a las placas de microtitulación cargadas con medio GCK al 50 %. Las placas de microtitulación se filtraron, se incubaron durante la noche a 37 °C con CO_2 al 5 % y las microcolonias se tificaron y cuantificaron. Los títulos de bactericida en suero se definieron como la dilución de suero recíproca interpolada que dio una reducción del 50 % de las UFC en comparación con las UFC en los pocillos control sin suero inmunitario. El título de EBS se define como el recíproco de la dilución interpolada del suero de ensayo que produce una reducción del 50 % de los recuentos de bacterias tras una incubación de 30 minutos a 37 °C. La susceptibilidad a la muerte con suero inmunológico P2086 se estableció si había un incremento de cuatro veces o mayor del título de EBS para el suero inmunológico P2086 en comparación con el correspondiente suero preinmunización. El límite de detección fue de 8 para los sueros de conejos. A los sueros negativos contra la cepa del ensayo a la dilución de partida se les asignó un título de la mitad del límite de detección para el ensayo (es decir, 4 para los conejos).

Citometría de flujo

Células MnB se cultivaron a una DO_{650} de 0,45-0,55 y luego se fijaron en paraformaldehído al 1 % (v/v) en 1 x PBS durante 10 minutos. Cien microlitros/pocillo de bacterias se sembraron en placas de poliestireno de 96 pocillo de fondo en U, se centrifugaron y se lavaron una vez en BSA al 1 % (p/v) en 1 x PBS. Se añadieron anticuerpos monoclonales anti-LP2086 a los sedimentos bacterianos, se resuspendieron e incubaron en hielo durante 30 minutos. Después de dos lavados en BSA al 1 %/PBS se añadió a los sedimentos celulares IgG biotinilada de cabra anti-ratón (subclases 1 + 2a + 2b + 3) (Jackson ImmunoResearch), se resuspendieron y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en estreptavidina-PE (BD Biosciences) y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Después de dos lavados en BSA al 1 %/PBS, los sedimentos celulares se resuspendieron en paraformaldehído al 1 %. Como control negativo se incluyó IgG de ratón. En u citómetro de flujo BD LSR II se adquirieron veinte mil (20.000) sucesos por pocillo y se analizaron usando el software FlowJo v7 (Treestar, Ashland, Oregón). La intensidad media de la fluorescencia (IMF) del canal PE se determinó para cada muestra después de acotar en células bacterianas en la representación logarítmica por puntos de FSC frente a SSC. Una IMF se consideró positiva si la IMF era tres veces la IMF de IgG control de ratón.

Ejemplo 2: Unión de polisorbato 80 a proteínas rLP2086

Para entender la estabilidad de la unión del polisorbato 80 a cada proteína rLP2086 A y B, una muestra de rLP2086 formulada con 200 µg/ml de la subfamilia A con aluminio (Al) y otra muestra de rLP2086 formulada con 200 µg/ml de la subfamilia B, almacenadas a 2-8°C y 25°C se analizaron 5 meses después para determinar su contenido de proteínas y polisorbato 80. También se analizó un placebo (tampón + A1 sin proteína). La distribución del polisorbato 80 en el placebo se muestra en la Figura 14, mientras que las distribuciones del polisorbato 80 para las proteínas de las subfamilias A y B se muestran en la Figura 15 y la Figura 16, respectivamente. La proporción molar total y la proporción molar de unidos para las subfamilias A y B se muestran en la Figura 15 y la Figura 16, respectivamente. La potencia relativa (%) para la subfamilia B se comparó con la proporción molar de unidos, tal como se muestra en la Figura 17.

Resultados

Como se muestra en la Figura 14, el % total de polisorbato 80 y el % de polisorbato 80 en el sobrenadante fueron iguales (0,017 %), lo que indica que el polisorbato 80 no se unió al aluminio o quedó atrapado en el sedimento. Además, el polisorbato 80 era estable tras 5 meses tanto a 2-8 °C como a 25 °C.

- 5 La distribución del polisorbato 80 en forma unida (sedimento), sin unir (sobrenadante) y total de las muestras de rLP2086 de la subfamilia A y la subfamilia B se muestra en la Figura 15 y la Figura 16, respectivamente. Aunque el % de polisorbato 80 en el sobrenadante y el sedimento para la subfamilia A a 2-8 °C y a 25 °C al punto de tiempo de 5 meses no cambió. No obstante, se observó más polisorbato 80 en el sedimento para la muestra de la subfamilia B a 25 °C al punto de tiempo de 5 meses. A pesar de las diferentes concentraciones de polisorbato 80 en el sobrenadante y en el sedimento a 2-8 °C y a 25 °C, se consiguió un equilibrio de masas preciso para ambas subfamilias. Dado que las proteínas rLP2086 se unen el 100 % al fosfato de aluminio en esta matriz, el polisorbato 80 asociado en el sedimento estaba muy probablemente unido a las moléculas de proteína.

- 15 Aunque tanto la proteína A como la B se unieron al polisorbato 80, la unión de la proteína A fue igual para las muestras almacenadas a 2-8°C y a 25°C, y la unión de la proteína B fue caso el doble para las muestras almacenadas a 25°C en comparación con las muestras almacenadas a 2-8°C. La potencia relativa para la subfamilia B se determinó tanto a 2-8 °C como a 25 °C a los puntos de tiempo T_0 y 5 meses y se encontró que se comportaba de forma inversa a la proporción molar de unidos descrita en la Figura 17. El % de la potencia disminuyó desde 120 a T_0 a 16 % a 5M/25 °C, mientras que la proporción molar de unidos aumentó desde 5,3 a 13,9 en el mismo periodo de tiempo.

Ejemplo 3: Estudio de la proporción molar crítica

- 20 Para determinar la concentración crítica del polisorbato 80 requerida para la estabilidad de rLP2086, se prepararon cuarenta (40) formulaciones de rLP2086 que contenían subfamilia A solo, subfamilia B solo y las subfamilias A y B a 200 µg/ml y 400 µg/ml con diferentes concentraciones de polisorbato 80 tal como se describe en la Tabla 1. Se determinaron las proteínas totales y unidas para cada muestra, así como el % de polisorbato 80 en el total, el sobrenadante y el sedimento a tiempo cero (T_0), a los 14 días y a 1 mes tanto a 2-8°C como a 25°C. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 18 a la Figura 24.

Tabla 1

Antígeno proteico total	Subfamilia de proteínas	% de Polisorbato 80						
		0,003	X	0,005	X	X	X	0,02
0	Placebo							
200	A	X	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01	0,02
200	B	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01	0,02
400	A+B	X	X	X	0,007	X	0,01	0,02
400	A	X	X	X	0,007	X	0,01	0,02
400	B	X	X	X	0,007	X	0,01	0,02

Resultados

- 30 Se determinaron las concentraciones de polisorbato 80 en el sobrenadante, el sedimento y en el total para las 40 muestras de formulación de rLP2086 con fosfato de aluminio. Las proporciones molares total y de unidos se determinaron para la subfamilia A y B y parecen ser similares para ambas subfamilias a 200 µg/ml que contienen polisorbato 80 al 0,005 % (proporción molar 5,4) o menor, como se muestra en la Figura 18 y la Figura 19, respectivamente. No obstante, la proporción molar total para la subfamilia B fue mucho mayor que la proporción molar de unidos para las muestras que contienen polisorbato 80 al 0,0065 % (proporción molar 7,0) o más. Los datos para las proporciones molares total y de unidos para la subfamilia A, la subfamilia y la subfamilia A + B a 400 µg/ml cada una también eran cercanas para las formulaciones que contienen polisorbato 80 al 0,008 % (proporción molar 8,6) o menor, no obstante, la proporción molar total fue mucho mayor que la proporción molar de unidos para las formulaciones que contienen polisorbato 80 al 0,017 % (proporción molar 18,4) como se ha descrito en la Figura 20.

Ejemplo 4: Unión de polisorbato 80 en el tiempo

- 40 El porcentaje (%) de polisorbato 80 en el sobrenadante y el sedimento para las muestras de formulación con la subfamilia A y B con AlPO_4 se determinó a T_0 , a 14 Días/25 °C, 1 Mes/4 °C y 1 Mes/25 °C. El % de polisorbato 80 en el sobrenadante para las muestras de formulación de las subfamilias A y B fue relativamente igual para las muestras almacenadas a 2-8 °C. No obstante, el % de polisorbato 80 en el sobrenadante disminuyó espectacularmente para las muestras almacenadas a 25 °C, incluso después de únicamente 14 días. El % de polisorbato 80 en el sedimento para las subfamilias A y B fue relativamente similar a T_0 /5°C y a 1 Mes/5°C. No obstante, el % de polisorbato 80 en el sobrenadante aumentó significativamente para las muestras almacenadas a 25 °C, especialmente para la subfamilia B que contiene 0,008 % de polisorbato 80 (proporción molar 8,6) o mayor. El % de polisorbato 80 también se determinó en el sobrenadante y el sedimento para las formulaciones de rLP2086 de las subfamilias A y B con AlPO_4 a T_0 , 14 días/25 °C, 1 mes/4 °C y 1 mes/25 °C. Como se muestra en la Figura 21, las concentraciones de polisorbato 80 para

las muestras que contenían 0,008 % fueron aproximadamente iguales para los 4 puntos de tiempo. No obstante, las concentraciones de polisorbato 80 aumentaron para la muestra que contenía 0,017 % de polisorbato 80 almacenadas a 25 °C. No se encontró polisorbato 80 en el sobrenadante de las muestras que contenían 0,008 % de polisorbato 80 o menos. Como se muestra en la Figura 22, la proporción molar de unidos fue estable para las muestras que contenían 0,008 % de polisorbato 80 o menos en los 4 puntos de tiempo. No obstante, la proporción molar de unidos aumentó para la muestra que contenía 0,017 % de polisorbato 80 almacenada a 25 °C.

La potencia para las muestras de formulación de las subfamilias A y B con AlPO_4 se determinó a T_0 y 14 Días/25 °C (Figura 22 y Figura 25, respectivamente). Como se ha descrito en la Figura 23, la potencia para la subfamilia A a diferentes proporciones molares totales varió de 91 a 102 tanto a 5 °C como a 25 °C. Aunque los resultados de la proporción molar de unidos también fueron relativamente iguales a cualquiera de las temperaturas, se observó un ligero incremento de la potencia a medida que aumentaba la proporción molar total/de unidos.

La potencia para la subfamilia B para las muestras a 5 °C fue de aproximadamente 95 % para proporciones molares totales de hasta 9,0. No obstante, la potencia de la subfamilia B disminuyó a un 79 % a medida que la proporción molar aumentaba a 18,1. Además, la muestra con la proporción molar total a 18,1 tenía una proporción molar de unidos mayor en comparación con la otra muestra. A 25 °C, la potencia de la subfamilia B exhibió un descenso significativo del 83 % al 5 % a medida que la proporción molar total aumentaba de 5,3 a 18,1. Los valores de la proporción molar de unidos para las muestras a 25 °C aumentaron de 5,3 a 13,8 a medida que la proporción molar total aumentaba. Por tanto, la potencia de la subfamilia B es inversamente proporcional a la proporción molar de unidos.

Las proteínas tanto de la subfamilia A como de la subfamilia B se unían al polisorbato 80. La unión de la subfamilia A fue la misma para las muestras almacenadas a 2-8°C y a 25°C, pero la unión de la subfamilia B fue casi el doble para las muestras almacenadas a 25°C. Además, el estudio de la proporción molar crítica indicó que las muestras de formulación a 200 µg/ml eran estables cuando contenían 0,008 % de polisorbato o menos, lo que es equivalente a una proporción molar total de 4,2 o menor.

Ejemplo 5: Concentración del detergente y potencia del antígeno rLP2086 de la subfamilia B

Estudios de estabilidad adicionales con concentraciones variables de polisorbato 80 corroboraron la calidad de crítica de la proporción molar entre el polisorbato 80 y la proteína para mantener la potencia. En un experimento, la composición inmunogénica se formuló a la dosis de 200 µg (concentración de proteína total 400 µg/ml) a pH 6,3 en solución salina tamponada con histidina 10 mM (HBS) con 0,5 mg/ml de aluminio (como fosfato de aluminio) y con picos de 0,01 %, 0,02 %, 0,05 % o 0,1 % de polisorbato 80 (proporción molar correspondiente entre polisorbato 80 y la proteína rLP2086 a 5,3, 10,7, 26,7 y 53,4). Las muestras formuladas se incubaron a 25 °C y las muestras control se almacenaron a 2-8°C. No se observó ningún cambio significativo de la potencia a tiempo "0" a concentraciones de polisorbato de hasta 0,1 %. No obstante, para periodos más prolongados de 2-8 °C, se observó una reducción de la potencia como una función de la temperatura y la concentración de polisorbato 80. A medida que la concentración de polisorbato 80 aumentaba de 0,01 % a 0,1 % en la composición inmunogénica, el punto de estabilidad a 3 meses demostró una reducción de la potencia de la proteína de la subfamilia B a menos del 10 % y del 25 % a 25 °C y a 2-8 °C, respectivamente (Figura 1).

Se realizó un estudio de estabilidad adicional (Figura 2) en el que se evaluó la proteína de la subfamilia B a una concentración de 4 mg/ml en HBS y con picos de polisorbato 80 hasta una concentración final de 0,06, 0,5 y 1 % (proporciones molares correspondientes de 3,3, 26,7 y 53,4). El control contenía 0,09 % de polisorbato 80. La proteína de la subfamilia B en 0,06 % de polisorbato 80 (proporción molar de 3,3) era estable. Las mismas muestras que contenían una concentración mayor de polisorbato 80 a 0,5 % y 1 % (proporciones molares de 26,7 y 53,4, respectivamente) eran inestables. Para las formulaciones de las composiciones inmunogénicas a 400 µg/ml, se observó inestabilidad de la proteína de la subfamilia B en todas las formulaciones que contenían una concentración de polisorbato 80 de 0,01 % (proporción molar 5,3) o mayor. No obstante, a concentraciones de 4 mg/ml de proteína y de 0,06 % de polisorbato 80 no se observó reducción de la potencia porque la proporción entre el polisorbato 80 y la proteína (3,3) es mejor que a concentraciones de 400 µg/ml de proteína más 0,01 % de polisorbato 80 (proporción molar 5,3). Por tanto, la reducción de la potencia de la proteína de la subfamilia B por el polisorbato 80 se correlaciona con la proporción molar entre el detergente polisorbato 80 y la proteína y no con la concentración absoluta del polisorbato 80 en la matriz.

De acuerdo con esto, la concentración de polisorbato 80 debe reducirse en la composición inmunogénica con el fin de mantener la estabilidad de la proteína de la subfamilia B en la vacuna y durante el posterior almacenamiento a 2--8°C. Se diseñó un estudio de estabilidad acelerada a 28 días para la composición inmunogénica con varias proporciones molares de polisorbato 80 (0,1, 0,1, 0,2 y 5,3) a dosis de 20 y 200 µg (Figura 3 y Figura 4). Se preparó una formulación bivalente (subfamilia A y subfamilia B) en solución salina tamponada con histidina 10 mM a pH 6,0, 0,05 mg/ml de aluminio en forma de fosfato de aluminio con varias concentraciones de polisorbato 80. Las muestras se incubaron a 25 °C junto con un grupo control a 2-8 °C. En las muestras se analizó la potencia a 0, 7, 14, 28 y 8 días. Las proteínas tanto de la subfamilia A (datos no mostrados) como de la subfamilia B eran estables para todos los grupos que contenían una proporción molar inferior a 5,3 entre el polisorbato 80 y la proteína. Un valor de potencia superior al 80 % se considera dentro de la variabilidad del ensayo. A la proporción molar de 5,3 se observó una tendencia

descendente para la potencia de la proteína de la subfamilia B para las muestras a 25 °C.

En un estudio exhaustivo se evaluó todas las posibles dosificaciones clínicas (20, 60, 120 y 200 µg) formuladas con varias proporciones molares entre el polisorbato 80 y la proteína en condiciones de estabilidad de almacenamiento acelerado para investigar los efectos de las proporciones molares entre el polisorbato 80 y la proteína sobre la estabilidad de las proteínas MnB rLP2086. Se usaron composiciones inmunogénicas bivalentes de MnB rLP2086 formuladas a proporciones molares entre el polisorbato 80 y la proteína que varían de aproximadamente 1,4 a 10,7. Para generar composiciones inmunogénicas formuladas a proporciones molares entre el polisorbato 80 y la proteína crecientes (1,4, 2,4, 3,4, 3,9, 4,3, 4,7 y 10,7), los antígenos se ajustaron a proporciones molares variables añadiendo polisorbato 80 de modo que, durante la formulación de la composición inmunogénica, no fuera necesario polisorbato 80 adicional. En este estudio se usaron dos grupos de lotes de antígenos. Un grupo de lotes de la subfamilia A y la subfamilia B se generó con una proporción molar entre el polisorbato 80 y la proteína de 1,4 y el otro grupo de 2,4. El grupo de proteínas con una proporción molar de 2,4 se usó para ajustar las proporciones molares de 3,4, 3,9, 4,3 y 10,7 con adiciones de polisorbato adicional. La matriz final de la composición inmunogénica fue histidina 10 mM, NaCl 150 mM, a pH 6,0, 0,5 mg/ml de fosfato de aluminio con las proporciones molares entre el polisorbato 80 y la proteína mencionadas anteriormente. Tras almacenamiento a 2-8 °C o a 25 °C durante intervalos específicos se aplicó mezclado suave con un agitador 24 horas antes del ensayo. Se analizaron la proteína total mediante IEX-HPLC, la potencia, el aspecto, la densidad óptica a 320 nm de la fracción sobrenadante y el pH.

Los resultados de potencia de las dosis de 200 y 20 µg se muestran en la Figura 5 y la Figura 6, respectivamente. El ensayo de potencia fue más sensible que otras pruebas usadas en el estudio. En general, no se observó una reducción significativa de la potencia para los antígenos ni de la subfamilia A ni de la subfamilia B, en comparación con el punto de tiempo inicial para todas las dosificaciones con proporciones molares de 4,3 y menores. Las formulaciones con una proporción molar de 4,7 se consideraron en el mínimo debido a una ligera reducción de la potencia para las proteínas de la subfamilia B almacenadas a 25 °C. Los resultados de potencia para el antígeno de la subfamilia B para formulaciones con una proporción molar de 10,7 fueron significativamente menores para las muestra almacenadas a 25 °C respecto a las almacenadas a 2-8 °C.

Ejemplo 6: Concentración de aluminio y potencia del antígeno rLP2086 de la subfamilia A y B

Se realizó una serie de experimentos para determinar el nivel óptimo de fosfato de aluminio para asegurar más de un 95 % de unión de las proteínas de la subfamilia A y B. Los estudios iniciales se centraron en la optimización de la formulación a pH 6,5. Las formulaciones se prepararon con una dosificación diana de 200 µg/ml de cada proteína de las proteínas de las subfamilias A y B en tampón de histidina 10 mM a pH 6,5 con 0,02 % de polisorbato 80 y 0,25 o 0,5 mg/ml de aluminio (como fosfato de aluminio). La proteína de la subfamilia B se unió al fosfato de aluminio en menor medida que la proteína de la subfamilia A (Figura 7). Aumentar el contenido de aluminio de 0,25 mg/ml a 0,5 mg/ml aumentó la unión de la proteína de la subfamilia B a > 80 %. Dado que el mecanismo de unión entre la proteína y la suspensión de aluminio es, principalmente, una interacción iónica, el pH de la suspensión es un factor que influye sobre la unión.

El pH de la formulación se optimizó para asegurar una unión superior al 90-95 % de la proteína de la subfamilia B. Se analizaron múltiples formulaciones a 200 µg/ml de cada una de las proteínas a y B con un pH variable de 5,6 a 6,5 con lotes diferentes de composiciones inmunogénicas (Figura 8). En las formulaciones con un pH que varía de 5,6 a 6,4 se produjeron uniones de más del 90-95 % de ambas proteínas. A medida que el pH de las formulaciones aumentaba a valores de 6,5 y mayores, la unión de la proteína de la subfamilia B se reducía significativamente. El pH diana recomendado es de 6,0 para asegurar una unión superior al 90 % de las proteínas de las subfamilias A y B.

También se evaluó la solidez de la formulación bajo variables y/o límites de formulación variando el pH, el tampón, la proteína y las concentraciones de polisorbato 80 (Figura 9). Aunque la unión de la proteína de la subfamilia A fue alta de un modo consistente (≥95 %) con la concentración de proteína hasta 500 µg/ml (250 µg/ml cada proteína), la unión de la proteína de la subfamilia B era más sensible a la concentración proteica y al pH. Dado que se usan formulaciones comerciales a una dosis de 200 µg, los resultados de este experimento avalaron también la formulación recomendada a un pH de 6,0 con 0,5 mg/ml de fosfato de aluminio.

Las formulaciones con y sin fosfato de aluminio se evaluaron para investigar la viabilidad de proporcionar una formulación estable sin fosfato de aluminio a concentraciones de polisorbato 80 lo suficientemente bajas para la estabilidad de la proteína de la subfamilia B. Las composiciones inmunogénicas se formularon a dosis de 20 y 200 µg de tampón de solución salina tamponada con histidina con una concentración de polisorbato 80 que varía de 0 a 5,3 proporciones molares. La mitad de las muestras se sometieron a agitación con un agitador de tipo vórtex multitubos digital a 500 rpm en modo de pulsos (2 segundos con y 1 segundo sin) durante 24 horas antes del análisis. Esta condición se adoptó para simular las pruebas ISTA (International Safe Transit Association) que normalmente se realizan en la última etapa de envío de la composición inmunogénica para imitar las vibraciones extremas durante las condiciones de envío.

Con agitación, las formulaciones sin fosfato de aluminio precipitaron, lo que, en última instancia, llevaron a la pérdida de potencia de los antígenos de la subfamilia A y la subfamilia B. Una prueba de aspecto (Figura 10) y las mediciones de la absorbancia a $\lambda = 320$ nm (Figura 11) demostraron la formación de agregados y/o precipitados cuando se agitaron

las formulaciones sin fosfato de aluminio. El análisis de la potencia de estas muestras (Figura 12 y Figura 13) demostró una pérdida significativa de potencia para ambas proteínas de la subfamilia A y la subfamilia B en todos los puntos de tiempo analizados. La pérdida de potencia fue más pronunciada en las formulaciones que contienen cantidades bajas de polisorbato 80. Dado que son necesarias cantidades bajas de polisorbato 80 para mantener la estabilización de la proteína de la subfamilia B, la inclusión de fosfato de aluminio en la formulación es necesaria para conservar la estabilidad. Las composiciones inmunogénicas de rLP2086 se pueden formular con fosfato de aluminio, que funcionará reforzando la estabilidad de la potencia, medida mediante el ensayo de potencia in vitro.

Ejemplo 7: Succinato e histidina como tampones

Se preparó una serie de formulaciones para comparar la unión de las proteínas rLP2086 de las subfamilias A y B en succinato e histidina, así como los efectos del pH, el polisorbato 80 y el $MgCl_2$ sobre la unión (Tabla 2). Se evaluó la solidez de la formulación bajo variables y/o límites de formulación variando el pH, el tampón, la proteína y las concentraciones de polisorbato 80 (Figuras 25 y 26). La unión de aluminio a la proteína de la subfamilia A y la subfamilia B fue similar, con independencia del tampón usado (histidina o succinato).

Tabla 2: Formulaciones para evaluar los tampones de histidina y succinato, $MgCl_2$, Polisorbato y el pH 5,6 – 6,0 sobre la unión de rLP2086 con $AlPO_4$ ¹

rLP2086 A (µg/ml)	rLP2086 B (µg/ml)	Histidina (mM)	Succinato (mM)	PS 80 (%)	Solución salina (%)	$MgCl_2$ (mM)	pH diana
200	200	0	5	0,020	0,9	0	6,0
200	200	0	5	0,020	0,9	0	5,8
200	200	0	5	0,020	0,9	0	5,6
200	200	0	5	0,010	0,9	0	6,0
200	200	0	5	0,005	0,9	0	6,0
250	250	0	5	0,020	0,9	0	6,0
250	250	0	5	0,020	0,9	0	5,8
250	250	0	5	0,020	0,9	0	5,6
200	200	0	10	0,020	0,9	0	6,0
200	200	0	20	0,020	0,9	0	6,0
200	200	0	5	0,020	0,9	10	6,0
200	200	10	0	0,020	0,9	0	6,0
200	200	10	0	0,020	0,9	0	5,8
200	200	10	0	0,020	0,9	0	5,6
200	200	10	0	0,010	0,9	0	6,0
200	200	10	0	0,005	0,9	0	6,0
250	250	10	0	0,020	0,9	0	6,0
250	250	10	0	0,020	0,9	0	5,8
250	250	10	0	0,020	0,9	0	5,6
200	200	5	0	0,020	0,9	0	6,0
200	200	20	0	0,020	0,9	0	6,0
200	200	10	0	0,020	0,9	10	6,0

¹Todas las formulaciones descritas en la Tabla 2 contienen 0,5 mg Al/ml.

El efecto de la sal tampón y el tiempo de mezclado sobre la unión a aluminio se evaluó con tres sales tampón de uso habitual, escogidas porque sus pKa están dentro del intervalo fisiológico y porque estas sales se consideran, en general, seguras. Las proteínas rLP2086 de las subfamilias A y B se formularon con una de las tres sales tampón: succinato 5 mM, histidina 10 mM o fosfato 10 mM a un pH adecuado para la pKa de cada sal para determinar la unión en cada condición. El tiempo requerido para la finalización de la unión se evaluó dejando que las muestras se mezclaran durante 5 o 120 minutos antes de medir la cantidad de proteína unida.

Como se muestra en la Figura 27, la proteína de la subfamilia B exhibió una unión reducida a un pH 6,8 en tampón fosfato, mientras que la proteína de la subfamilia A no se vio significativamente afectada a las mismas condiciones. La cantidad de proteína unida a aluminio fue similar en las muestras formuladas con histidina o succinato. Por tanto, estas dos sales tampón se escogieron para su posterior evaluación. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, es posible que la menor unión en el tampón fosfato es el resultado de la competición por los sitios de unión en $AlPO_4$ con los iones fosfato añadidos.

En estas condiciones y concentraciones de proteína y $AlPO_4$, la unión se completó tras 5 minutos de mezcla a temperatura ambiente, ya que se obtuvieron resultados similares tras mezclar durante 2 horas.

Para analizar después si la menor unión de la proteína de la subfamilia B en tampón fosfato a pH 6,8 se debía al pH o a diferencias entre las sales tampón, se midió la unión en un intervalo de pH de 5,3 a 7,0 en formulaciones tamponadas con histidina o con succinato. Se prepararon formulaciones bivalentes que contenían 0,2 mg/ml de las proteínas de cada subfamilia (0,4 mg/ml de proteína total), 0,02 % de PS80, 0,5 mg Al/ml y NaCl 150 mM. Las muestras se formularon en histidina 10 mM o succinato 5 mM para comparar el efecto de la sal tampón. Tras la formulación, el pH de cada muestra se verificó de forma individual.

El perfil de la unión del pH 5,3 a 7,0 se muestra en la proteína de la subfamilia A en la Figura 28 y para la proteína de la subfamilia B en la Figura 28. La proteína de la subfamilia A exhibieron pocos cambios en la cantidad de la proteína unida, permaneciendo la unión por encima del 95 % en el intervalo de pH analizado. Una formulación que contiene histidina con un pH 7,0 dio como resultado un pH de 6,8. El pH no se ajustó a 7,0 (p. ej., mediante la adición de base) para evitar los posibles efectos sobre la proteína o AlPO_4 y, por tanto, los resultados para estos puntos de datos no están disponibles.

El perfil de unión de la proteína de la subfamilia B (mostrado en la Figura 29) exhibió una tendencia dependiente del pH. No obstante se realizará la unión en formulaciones tamponadas con histidina o con succinato, la cantidad de proteína unida al aluminio fue similar. La unión dependía del pH de la formulación en lugar de de la sal tampón. La unión permaneció en un 95 % hasta un pH de 6,5 (94 % en histidina, 95 % en succinato), pero disminuyó cuando el pH era superior a 6,5. A pH 7,0, la unión disminuyó a aproximadamente 82 %, con diferencias pequeñas entre las sales tampón.

Para obtener una unión sólida de la proteína de la subfamilia B con AlPO_4 a estas concentraciones se prefiere un pH de 6,5 o menor.

Ejemplo 8: Estudio de seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad (Ejemplo de referencia)

Se realiza un estudio para evaluar la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de la vacuna de rLP2086 administrada en una población de adolescentes sanos conforme a regímenes de 0 y 2 meses; 0, 2 y 6 meses; 0 y 2 meses, seguido de una dosis de refuerzo de 12 meses.

La composición inmunogénica es una vacuna contra rLP2086 (lipidada recombinante). La composición inmunogénica incluye una proteína ORF2086 recombinante del serogrupo B de *N. meningitidis* que se expresó en *Escherichia coli* y se formuló en una vacuna bivalente compuesta por una cepa de la subfamilia A y una cepa de la subfamilia B de rLP2086. En particular, la composición inmunogénica es una dosis de 0,5 ml formulada para contener 60 µg, 120 µg o 200 µg cada uno de una subfamilia A purificada y una proteína rLP2086 de la subfamilia B purificada, una relación molar de 2,8 del polisorbato 80 y 0,25 mg de Al^{3+} como AlPO_4 , solución salina tamponada con histidina 10 mM de a pH 6,0. Una composición de control incluye una solución salina normal (cloruro de sodio al 0,9 %) en una dosis de 0,5 ml.

Los sujetos son asignados aleatoriamente a 5 grupos. Véase la Tabla 3. Los sujetos se clasifican en dos grupos de edad, ≥ 11 a < 14 y ≥ 14 a < 19 años de edad.

Tabla 3: Diseño del estudio							
	Vacunación 1	Vacunación 2	Extracción de sangre posvacunación 2	Vacunación 3	Extracción de sangre posvacunación 3	Vacunación 4	Extracción de sangre posvacunación 4
Número de visita	1	2	3	4	5	6	7
Mes aproximado	0	2	3	6	7	12	13
Grupo 1	rLP2086	rLP2086		Solución salina		Solución salina	
Grupo 2	rLP2086	rLP2086		rLP2086		Solución salina	
Grupo 3	rLP2086	rLP2086		Solución salina		rLP2086	
Grupo 4	rLP2086	Solución salina		rLP2086		Solución salina	
Grupo 5	Solución salina	Solución salina		rLP2086		rLP2086	
	Vacunación 1	Vacunación 2	Extracción de sangre posvacunación 2	Vacunación 3	Extracción de sangre posvacunación 3	Vacunación 4	Extracción de sangre posvacunación 4
Extracción de sangre	20 ml		20 ml		20 ml	20 ml	20 ml

La solución salina se usa como placebo porque no existe una vacuna segura, inmunogénica y efectiva probada contra

MnB que pueda servir como un control activo.

Los sujetos reciben una dosis de la vacuna de rLP2086 o solución salina en cada una de las visitas de vacunación (por ejemplo, las visitas 1, 2, 4 y 6) de acuerdo con la Tabla 3. Se observan las prácticas estándar de vacunación y la vacuna no se inyecta en los vasos sanguíneos. La vacuna de rLP2086 se administra por vía intramuscular inyectando 0,5 ml en el músculo deltoides superior. La solución salina se administra por vía intramuscular en el músculo deltoides superior.

A. Visita 1

En la visita 1, día 1, vacunación 1, primero se extrae la sangre del sujeto y luego recibe una vacunación. La extracción de sangre de la visita 1 y la vacunación 1 ocurren el mismo día. Antes de la vacunación, se recoge una muestra de sangre (aproximadamente 20 ml) del sujeto. Para los sujetos asignados al azar al grupo 1, 2, 3 y 4, se administra una sola inyección intramuscular de 0,5 ml de la vacuna de rLP2086 en el músculo deltoides superior. Para los sujetos del grupo 5, se administra una sola inyección intramuscular de 0,5 ml de solución salina al músculo deltoides superior.

B. Visita 2 (de 42 a 70 días después de la Visita 1), vacunación 2

Para los grupos 1, 2 y 3, se administra una sola inyección intramuscular de 0,5 ml de la vacuna de rLP2086 en el músculo deltoides superior. Para los grupos 4 y 5, se administra una sola inyección intramuscular de 0,5 ml de solución salina al músculo deltoides superior.

C. Visita 3 (de 28 a 42 días después de la visita 2), extracción de sangre posvacunación 2

Se recoge una muestra de sangre (aproximadamente 20 ml) del sujeto.

D. Visita 4 (de 105 a 126 días después de la Visita 2), vacunación 3

Para los grupos 2, 4 y 5, se administra una sola inyección intramuscular de 0,5 ml de la vacuna de rLP2086 en el músculo deltoides superior. Para los grupos 1 y 3, se administra una sola inyección intramuscular de 0,5 ml de solución salina al músculo deltoides superior.

E. Visita 5 (de 28 a 42 días después de la visita 4), extracción de sangre posvacunación 3

Se recoge una muestra de sangre (aproximadamente 20 ml) del sujeto.

F. Visita 6 (de 161 a 175 días después de la Visita 4), vacunación 4

En la visita 6, primero se extrae sangre del sujeto y luego recibe una vacunación. La extracción de sangre de la visita 6 y la vacunación 4 ocurren el mismo día. Antes de la vacunación, se recoge una muestra de sangre (aproximadamente 20 ml) del sujeto. Para los grupos 3 y 5, se administra una sola inyección intramuscular de 0,5 ml de la vacuna de rLP2086 en el músculo deltoides superior. Para los sujetos de los grupos 1, 2 y 4 se administra una sola inyección intramuscular de 0,5 ml de solución salina al músculo deltoides superior.

G. Visita 7 (de 28 a 42 días después de la visita 6), extracción de sangre posvacunación 4

Se recoge una muestra de sangre (aproximadamente 20 ml) del sujeto.

Resultados de inmunogenicidad

El objetivo principal de este estudio era evaluar la inmunogenicidad de 60 µg, 120 µg y 200 µg de la vacuna de rLP2086, medida mediante SBA realizada con cepas de MnB que expresan las proteínas LP2086 de la subfamilia A y B.

El objetivo secundario de este estudio era evaluar la inmunogenicidad de 60 µg, 120 µg y 200 µg de la vacuna de rLP2086 determinada mediante cuantificación de la unión de Ig a las proteínas de la vacuna rLP2086 de la subfamilia A y B.

La actividad de SBA se evaluó usando 3 cepas de subfamilia A y 3 de la subfamilia B como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Análisis de los sujetos que alcanzaron el título de SBA de elevación de ≥ 4 veces con respecto a antes de la dosis 2- Población d mITT (Estudio 6108A1-2001-WW / B1971005)

Cepa	Grupo de vacunas aleatorizado	N ^a	n ^b (%)	(IC del 95 % ^c)	Valor p ^d
1 mes después de la dosis 2					
Cepa 1 subfamilia A	Control	80	1 (1,3)	(0,0, 6,8)	>0,9999
	60 µg de la vacuna de rLP2086	18	16 (88,9)	(65,3, 98,6)	0,0007
	120 µg de la vacuna de rLP2086	115	96 (83,5)	(75,4, 89,7)	<0,0001
	200 µg de la vacuna de rLP2086	106	93 (87,7)	(79,9, 93,3)	<0,0001

ES 2 850 973 T5

Cepa 1 subfamilia B		Control	84	0 (0,0)	(0,0, 4,3)	>0,9999
		60 µg de la vacuna de rLP2086	21	15 (71,4)	(47,8, 88,7)	0,0392
		120 µg de la vacuna de rLP2086	121	72 (59,5)	(50,2, 68,3)	0,0225
		200 µg de la vacuna de rLP2086	114	68 (59,6)	(50,1, 68,7)	0,0244
1 mes después de la dosis 3						
Cepa 1 subfamilia A		Control	73	4 (5,5)	(1,5, 13,4)	>0,9999
		60 µg de la vacuna de rLP2086	19	17 (89,5)	(66,9, 98,7)	0,0004
		120 µg de la vacuna de rLP2086	111	103 (92,8)	(86,3, 96,8)	<0,0001
		200 µg de la vacuna de rLP2086	100	94 (94,0)	(87,4, 97,8)	<0,0001
Cepa 1 subfamilia B		Control	79	1 (1,3)	(0,0, 6,9)	>0,9999
		60 µg de la vacuna de rLP2086	21	17 (81,0)	(58,1, 94,6)	0,0036
		120 µg de la vacuna de rLP2086	112	97 (86,6)	(78,9, 92,3)	<0,0001
		200 µg de la vacuna de rLP2086	105	89 (84,8)	(76,4, 91,0)	<0,0001

Abreviatura: IC= intervalo de confianza; SBA = ensayo bactericida en suero,

Nota: La validación del ensayo soporta un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de la subfamilia A cepa 1 = 9 y subfamilia B cepa 1 = 10, Los títulos de SBA por encima del LLOQ se consideran precisos y sus valores cuantitativos se notificarán, Los valores por debajo de LLOQ o denotados por debajo del LLOQ se establecerán en 0,5 * LLOQ para el análisis,

Las proporciones de los sujetos con títulos que alcanzan un nivel definido se presentan en la Tabla 5. Para ambas subfamilias, las proporciones de sujetos que alcanzaron títulos de SBA definidos fueron mayores en la posdosis 3 que en la posdosis 2.

Tabla 5: Sujetos que alcanzaron niveles de títulos de SBA definidos en la fase 1 - Población de mITT (estudio 6108A1-2001-WW / B1971005)

Grupo de vacuna (según se ha aleatorizado)																		
Vacuna de rLP2086																		
Cepa	Punto de tiempo de obtención de muestras	Título de SBA	Control			60 µg			120 µg			200 µg						
			Nº	nº	%	(IC del 95 %)	Nº	nº	%	(IC del 95 %)	Nº	nº	%	(IC del 95 %)				
Cepa 2 subfamilia A	Antes de la dosis 1	32	64	7	10,9	(5,3, 21,2)	15	0	0,0	(0,2,35,8)	90	9	10,0	(5,3, 18,1)	92	11	12,0	(6,7, 20,3)
		64	64	2	3,1	(0,8, 11,7)	15	0	0,0	(0,2,35,8)	90	7	7,8	(3,8, 15,4)	92	5	5,4	(2,3, 12,4)
		128	64	0	0,0	(0,0, 11,2)	15	0	0,0	(0,2,35,8)	90	1	1,1	(0,2, 7,5)	92	0	0,0	(0,0, 8,0)
		32	69	3	4,3	(1,4, 12,6)	21	20	95,2	(72,9, 99,3)	115	113	98,3	(93,3,98,6)	115	105	91,3	(84,6, 95,3)
		64	69	1	1,4	(0,2,9,6)	21	18	85,7	(63,9, 95,3)	115	95	82,6	(74,6, 88,5)	115	83	72,2	(63,3, 79,6)
		128	69	1	1,4	(0,2,9,6)	21	11	52,4	(31,8, 72,1)	115	51	44,3	(35,5,53,5)	115	49	42,6	(33,9, 51,8)
	1 mes después de la dosis 3	32	57	5	8,8	(3,7, 19,4)	19	18	94,7	(70,6, 99,3)	108	108	100,0	(93,1, 100,0)	99	98	99,0	(93,2, 99,9)
		64	57	3	5,3	(1,7, 15,1)	19	18	94,7	(70,6, 99,3)	108	103	95,4	(89,4, 98,1)	99	90	90,9	(83,4, 95,2)

(continuación)

Grupo de vacuna (según se ha aleatorizado)																		
Vacuna de rLP2086																		
Cepa	Punto de tiempo de obtención de muestras	Control				60 µg				120 µg				200 µg				
		Título de SBA	Nº	nº	%	{IC del 95 % ^{c)} }	Nº	nº	%	{IC del 95 % ^{c)} }	Nº	nº	%	{IC del 95 % ^{c)} }	Nº	nº	%	{IC del 95 % ^{c)} }
Cepa 1 subfamilia A	Antes de la dosis 1	128	57	2	3,5	{0,9, 13,0}	19	13	68,4	{45,2, 85,1}	108	73	67,6	{58,2, 75,7}	99	67	67,7	{57,9, 76,1}
		16	81	10	12,3	{6,8, 21,4}	21	1	4,8	{0,7, 27,1}	122	11	9,0	{5,1, 15,6}	114	7	6,1	{3,0, 12,3}
		32	81	6	7,4	{3,4, 15,5}	21	1	4,8	{0,7, 27,1}	122	7	5,7	{2,8, 11,5}	114	5	4,4	{1,8, 10,1}
		64	81	4	4,9	{1,9, 12,4}	21	0	0,0	{0,1, 28,2}	122	3	2,5	{0,8, 7,3}	114	2	1,8	{0,4, 6,7}
		128	81	1	1,2	{0,2, 8,2}	21	0	0,0	{0,1, 28,2}	122	1	0,8	{0,1, 5,6}	114	0	0,0	{0,0, 6,6}
1 mes después de la dosis 2	16	83	6	7,2	{3,3, 15,2}	18	16	88,9	{64,8, 97,2}	118	105	89,0	{81,9, 93,5}	110	100	90,9	{83,9, 95,0}	
	32	83	3	3,6	{1,2, 10,6}	18	16	88,9	{64,8, 97,2}	118	101	85,6	{78,0, 90,9}	110	90	81,8	{73,5, 88,0}	
	64	83	1	1,2	{0,2, 8,1}	18	15	83,3	{59,1, 94,5}	118	70	59,3	{50,2, 67,8}	110	71	64,5	{55,2, 72,9}	
	128	83	0	0,0	{0,0, 8,9}	18	6	33,3	{15,8, 57,1}	118	33	28,0	{20,6, 36,7}	110	44	40,0	{31,3, 49,4}	
	16	76	9	11,8	{6,3, 21,2}	20	18	90,0	{67,6, 91,0}	114	110	96,5	{91,0, 99,2}	104	100	96,2	{90,2, 99,2}	

(continuación)

Grupo de vacuna (según se ha aleatorizado)																		
Vacuna de rLP2086																		
Cepa	Punto de tiempo de obtención de muestras	Título de SBA	Control			60 µg			120 µg			200 µg						
			Nº	n ^b	%	(IC del 95 % ^c)	Nº	n ^b	%	(IC del 95 % ^c)	Nº	n ^b	%	(IC del 95 % ^c)	Nº	n ^b	%	(IC del 95 % ^c)
Cepa 3 subfamilia A	Antes de la dosis 1	32	76	6	7,9	(3,6, 16,5)	20	18	90,0	(67,6, 97,5)	114	108	94,7	(88,8, 97,6)	104	99	95,2	(89,0, 98,0)
			76	3	3,9	(1,3, 11,5)	20	17	85,0	(62,4, 95,1)	114	102	89,5	(82,4, 93,9)	104	91	87,5	(79,7, 92,6)
			128	76	1	1,3	(0,2, 8,8)	20	8	40,0	(21,4, 62,0)	114	78	68,4	(59,3, 76,3)	104	63	60,6
		64	80	8	10,0	(5,1, 18,7)	21	1	4,8	(0,7, 27,1)	119	9	7,6	(4,0, 13,9)	115	7	6,1	(2,9, 12,2)
			80	6	7,5	(3,4, 15,7)	21	1	4,8	(0,7, 27,1)	119	6	5,0	(2,3, 10,8)	115	5	4,3	(1,8, 10,0)
			80	2	2,5	(0,6, 9,4)	21	0	0,0	(0,1, 28,2)	119	1	0,8	(0,1, 5,7)	115	4	3,5	(1,3, 8,9)
	1 mes después de la dosis 2	128	80	1	1,3	(0,2, 8,3)	21	0	0,0	(0,1, 28,2)	119	0	0,0	(0,0, 6,3)	115	0	0,0	(0,0, 6,1)
		16	81	10	12,3	(6,8, 21,4)	20	17	85,0	(62,4, 95,1)	117	111	94,9	(89,1, 97,7)	107	103	96,3	(90,5, 98,6)
		32	81	9	11,1	(5,9, 20,0)	20	17	85,0	(62,4, 95,1)	117	106	90,6	(83,8, 94,7)	107	95	88,8	(81,3, 93,5)

(continuación)													
Grupo de vacuna (según se ha aleatorizado)													
Vacuna de rLP2086													
Cepa	Punto de tiempo de obtención de muestras	Control				60 µg				120 µg			
		Título de SBA	N ^a	n ^b	%	(IC del 95 % ^c)	N ^a	n ^b	%	(IC del 95 % ^c)	N ^a	n ^b	%
1 mes después de la dosis 3		64	81	8	9,9	(5,0, 18,5)	20	16	80,0	(57,2, 92,3)	117	94	80,3
													(72,1, 86,6)
		128	81	2	2,5	(0,6,9,3)	20	9	45,0	(25,3, 66,4)	117	46	39,3
													(30,9, 48,4)
		16	78	9	11,5	(6,1, 20,7)	21	20	95,2	(72,9, 99,3)	114	111	97,4
													(92,2, 99,1)
		32	78	7	9,0	(4,3, 17,6)	21	18	85,7	(63,9, 95,3)	114	107	93,9
													(87,7, 97,0)
		64	78	3	3,8	(1,2, 11,3)	21	15	71,4	(49,2, 86,6)	114	104	91,2
													(84,5, 96,2)
		128	78	2	2,6	(0,6,9,7)	21	13	61,9	(40,2, 79,7)	114	85	74,6
													(65,8, 81,7)
Cepa 1 subfamilia B	Antes de la dosis 1	16	84	3	3,6	(1,2, 10,5)	22	0	0,0	(0,1, 27,3)	124	2	1,6
													(0,4, 6,2)
		32	84	1	1,2	(0,2, 8,0)	22	0	0,0	(0,1, 27,3)	124	1	0,8
													(0,1, 5,5)
		64	84	0	0,0	(0,0, 8,8)	22	0	0,0	(0,1, 27,3)	124	1	0,8
													(0,1, 5,5)
		128	84	0	0,0	(0,0, 8,8)	22	0	0,0	(0,1, 27,3)	124	1	0,8
													(0,1, 5,5)

(continuación)																		
Grupo de vacuna (según se ha aleatorizado)																		
Vacuna de rLP2086																		
Cepa	Punto de tiempo de obtención de muestras	Título de SBA	Control			60 µg			120 µg			200 µg						
			Nº	nº	%	(IC del 95 % ^a)	Nº	nº	%	(IC del 95 % ^a)	Nº	nº	%	(IC del 95 % ^a)				
	1 mes después de la dosis 2	16	84	1	1,2	(0,2, 8,0)	21	16	76,2	(54,0, 89,7)	122	84	68,9	(60,1, 76,4)	114	75	65,8	(56,6, 74,9)
		32	84	0	0,0	(0,0, 8,8)	21	12	57,1	(36,0, 76,0)	122	56	45,9	(37,3, 54,8)	114	55	48,2	(39,2, 57,4)
		64	84	0	0,0	(0,0, 8,8)	21	9	42,9	(24,0, 64,0)	122	31	25,4	(18,5, 33,9)	114	25	21,9	(15,3, 30,4)
		128	84	0	0,0	(0,0, 8,8)	21	3	14,3	(4,7, 36,1)	122	9	7,4	(3,9, 13,6)	114	10	8,8	(4,8, 15,5)
	1 mes después de la dosis 3	16	79	3	3,8	(1,2, 11,1)	21	18	85,7	(63,9, 95,3)	113	102	90,3	(83,3, 94,5)	105	90	85,7	(77,6, 91,2)
		32	79	1	1,3	(0,2, 8,4)	21	17	81,0	(58,8, 92,7)	113	89	78,8	(70,3, 85,3)	105	83	79,0	(70,2, 85,6)
		64	79	0	0,0	(0,0,9,3)	21	12	57,1	(36,0, 76,0)	113	59	52,2	(43,0, 61,2)	105	63	60,0	(50,4, 68,9)
		128	79	0	0,0	(0,0,9,3)	21	9	42,9	(24,0, 64,0)	113	22	19,5	(13,2, 27,8)	105	20	19,0	(12,6, 27,7)

(continuación)														
Grupo de vacuna (según se ha aleatorizado)														
Vacuna de rLP2086														
Cepa	Punto de tiempo de obtención de muestras	Título de SBA	Control			60 µg			120 µg			200 µg		
			N ^a	n ^b	%	(IC del 95 % ^c)	N ^a	n ^b	%	(IC del 95 % ^c)	N ^a	n ^b	%	(IC del 95 % ^c)
Cepa 2 subfamilia B	Antes de la dosis 1	16	83	2	2.4	(0.6, 9.1)	22	0	0.0	(0.1, 27.3)	118	3	2.5	(0.8, 7.6)
		32	83	2	2.4	(0.6, 9.1)	22	0	0.0	(0.1, 27.3)	118	3	2.5	(0.8, 7.6)
		64	83	1	1.2	(0.2, 8.1)	22	0	0.0	(0.1, 27.3)	118	1	0.9	(0.1, 5.8)
		128	83	0	0.0	(0.0, 8.9)	22	0	0.0	(0.1, 27.3)	118	0	0.0	(0.0, 6.4)
	1 mes después de la dosis 2	16	84	2	2.4	(0.6, 9.0)	19	4	21.1	(8.1, 44.6)	102	33	32.4	(24.0, 42.0)
		32	84	2	2.4	(0.6, 9.0)	19	4	21.1	(8.1, 44.6)	102	31	30.4	(22.3, 40.0)
		64	84	1	1.2	(0.2, 8.0)	19	1	5.3	(0.7, 29.4)	102	23	22.5	(15.5, 31.7)
		128	84	0	0.0	(0.0, 8.8)	19	0	0.0	(0.2, 30.4)	102	11	10.8	(6.1, 18.4)
	1 mes después de la dosis 3	16	68	4	5.9	(2.2, 14.6)	15	8	53.3	(29.3, 75.9)	86	65	75.6	(65.4, 83.5)
		32	68	3	4.4	(1.4, 12.8)	15	8	53.3	(29.3, 75.9)	86	65	75.6	(65.4, 83.5)

(continuación)													
Grupo de vacuna (según se ha aleatorizado)													
Vacuna de rLP2086													
Cepa	Punto de tiempo de obtención de muestras	Control				60 µg				120 µg			
		Título de SBA	N ^a	n ^b	%	(IC del 95 %)	N ^a	n ^b	%	(IC del 95 %)	N ^a	n ^b	%
Cepa 3 subfamilia B	Antes de la dosis 1	64	68	1	1.5	(0.2, 9.7)	15	7	46.7	(24.1, 70.7)	86	52	60.5
													(47.1, 68.2)
		128	68	0	0.0	(0.0, 10.6)	15	4	26.7	(10.4, 53.3)	86	24	27.9
													(19.5, 38.3)
													(16.5, 35.2)
	1 mes después de la dosis 2	8	81	2	2.5	(0.6, 9.3)	22	0	0.0	(0.1, 27.3)	120	4	3.3
													(1.3, 8.5)
		16	81	1	1.2	(0.2, 8.2)	22	0	0.0	(0.1, 27.3)	120	2	1.7
													(0.4, 6.4)
		32	81	0	0.0	(0.0, 9.1)	22	0	0.0	(0.1, 27.3)	120	0	0.0
													(0.0, 6.3)
	1 mes después de la dosis 2	64	81	0	0.0	(0.0, 9.1)	22	0	0.0	(0.1, 27.3)	120	0	0.0
													(0.0, 6.3)
		128	81	0	0.0	(0.0, 9.1)	22	0	0.0	(0.1, 27.3)	120	0	0.0
													(0.0, 6.3)
													(0.1, 5.9)
													(0.1, 5.9)
	1 mes después de la dosis 2	8	81	1	1.2	(0.2, 8.2)	21	13	61.9	(40.2, 79.7)	115	79	68.7
													(59.7, 76.5)
		16	81	0	0.0	(0.0, 9.1)	21	13	61.9	(40.2, 79.7)	115	70	60.9
													(51.7, 69.3)
		32	81	0	0.0	(0.0, 9.1)	21	10	47.6	(27.9, 68.2)	115	50	43.5
													(34.7, 52.7)

Abreviaturas: IC = intervalo de confianza; SBA = ensayo bactericida en suero; LLOQ = límite inferior de cuantificación; Nota: LLOQ para A/1 = 9, A/2 = 18, A/3 = 12, B/1 = 10, B/2 = 9, B/3 = 7.

Los datos de inmunogenicidad muestran que la vacuna puede generar anticuerpos con actividad SBA significativa contra cepas de la subfamilia A y cepas de la subfamilia B de MnB. Para la cepa 2 de la subfamilia A, después de la dosis 2, las tasas de respuesta de la SBA variaron de 88,9 % a 90,9 % y, después de la dosis 3, las tasas de respuesta de la SBA variaron de 90,0 % a 97,4 %. Para la variante de la cepa 1 de la subfamilia A, después de la dosis 2 y la dosis 3, el 100,0 % de los sujetos tuvieron respuestas de SBA a esta variante en los niveles de dosis de 60 µg y 120 µg. En el nivel de dosis de 200 µg, el 96,5 % y el 99,0 % de los sujetos tuvieron respuestas de SBA después de la dosis 2 y la dosis 3, respectivamente. Para la variante de la cepa 1 de la subfamilia A, las tasas de respuesta de la SBA variaron de 85,0 % a 96,3 % después de la dosis 2 y de 95,2 % a 97,4 % después de la dosis 3.

Para la variante de la cepa 1 de la subfamilia B, después de la dosis 2, las tasas de respuesta de la SBA variaron de 76,2 % a 81,0 % y, después de la dosis 3, las tasas de respuesta de la SBA variaron de 89,5 % a 92,0 %. Para la variante de la cepa 2 de la subfamilia B después de la dosis 2, el porcentaje de sujetos con tasas de respuesta de SBA osciló de 21,1 % a 33,3 %. Sin embargo, después de la tercera dosis, el 53,3 %, 75,6 % y 67,9 % de los sujetos tuvieron respuestas SBA a los niveles de dosis de 60 µg, 120 µg y 200 µg, respectivamente. Para la variante de la cepa 3 de la subfamilia B, las tasas de respuesta de la SBA variaron de 61,9 % a 70,8 % después de la dosis 2 y de 76,2 % a 88,7 % después de la dosis 3.

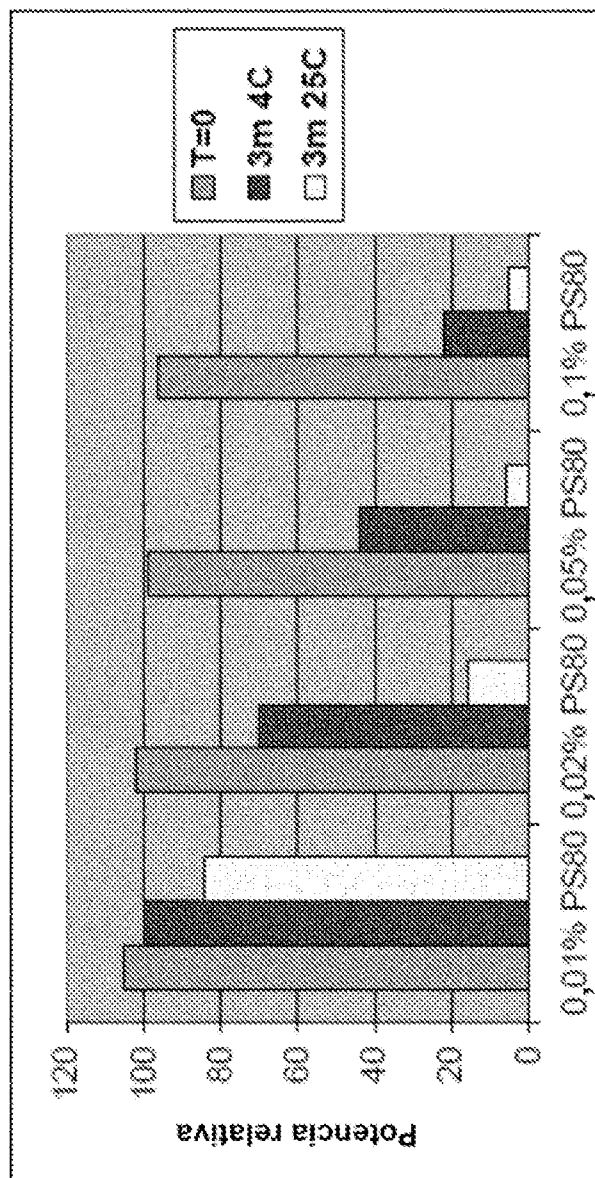
En general, una alta proporción de sujetos respondieron con un título SBA $\geq$ LLOQ independientemente de la cepa de la subfamilia A o la subfamilia B analizada. Los datos de la hSBA mostraron respuestas inmunes sólidas a dosis de 60 µg a 200 µg sin una clara relación dosis-respuesta. La frecuencia de respuesta, independientemente del análisis examinado, fue la más alta numéricamente en el grupo de 120 µg. El grupo de 200 µg no tenía respuestas inmunitarias mejoradas sobre el nivel de dosis de 120 µg.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para estabilizar la potencia de un polipéptido LP2086 (fHBP) de la subfamilia B en una composición que consiste esencialmente en de aproximadamente una proporción molar de Polisorbato 80 y la proteína de 2,8:1, 0,5 mg/ml de aluminio como AlPO_4 , histidina 10 mM, pH 6,0 y NaCl 150 mM.
- 5 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la etapa de (b) liofilizar la composición inmunogénica.

FIGURA 1

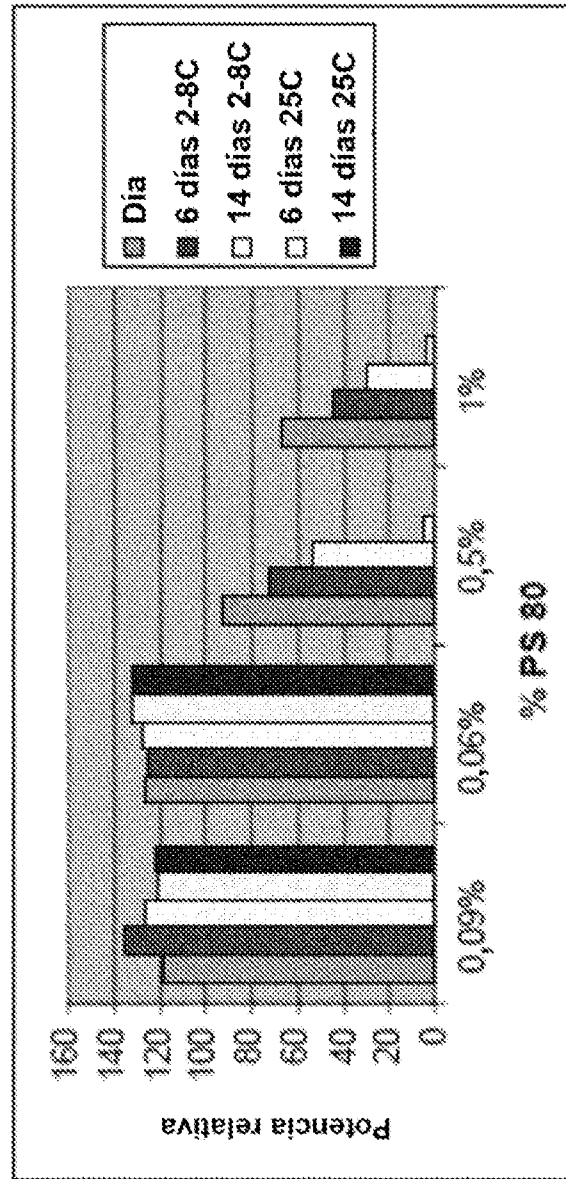
Estabilidad de la subfamilia B en las formulaciones con varias concentraciones de polisorbato 80



Se formularon 200 µg/ml de cada una de las subfamilias A y B en tampón de histidina 10 mM a pH 6,3 con 0,5 mg/ml de aluminio y concentraciones variables de polisorbato 80. Las formulaciones se cargaron en jeringas BD y se almacenaron a 2-8 °C o 25 °C. Se muestran los valores de potencia para la subfamilia B al principio y en el punto de tiempo de 3 meses

FIGURA 2

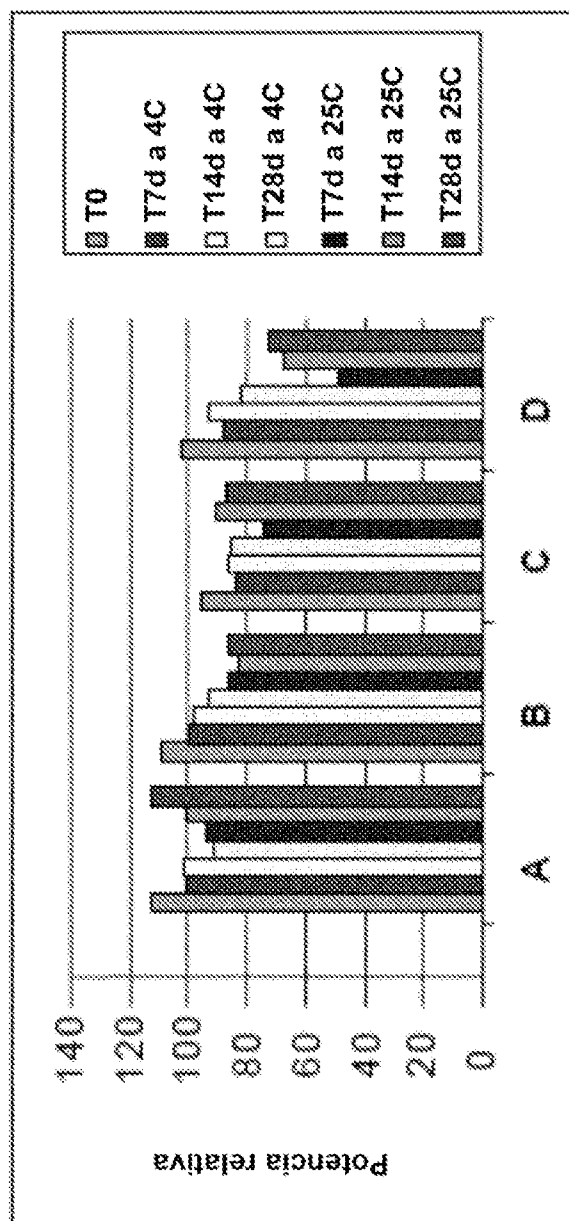
Estabilidad acelerada de la subfamilia B con varias concentraciones de polisorbato 80



La sustancia farmacológica de la subfamilia B formulada en 0,09 % de polisorbato 80, histidina 10 mM, pH 6,5 se enfrió con concentraciones variables de polisorbato 80 para monitorizar el efecto del polisorbato 80 sobre la estabilidad. Las muestras se almacenaron a 2-8 °C o 25 °C se midió la potencia a los puntos de tiempo inicial, 6 días y 14 días.

FIGURA 3

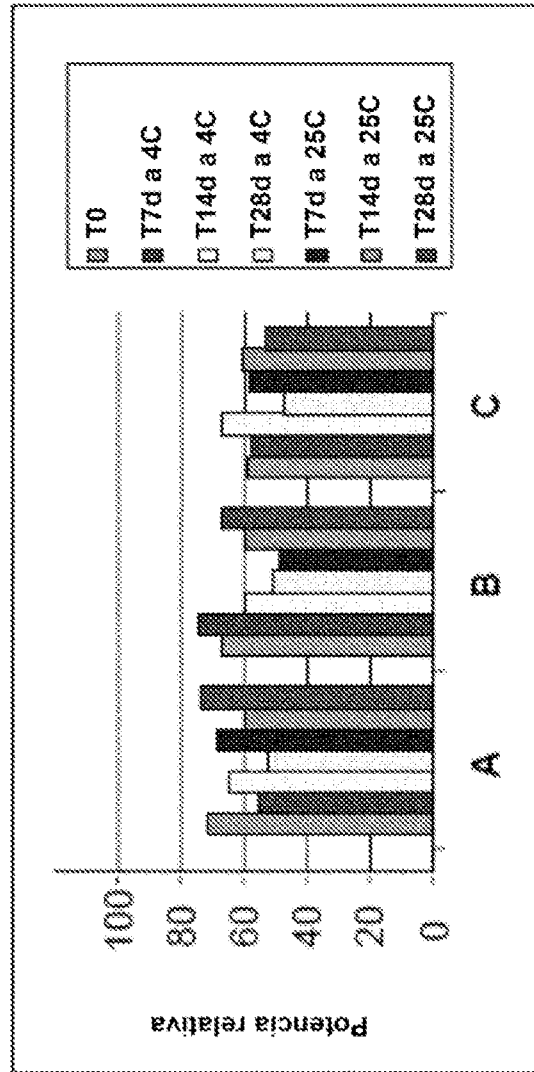
Potencia de la subfamilia B a 200 µg/ml durante 28 días



MnB rLP2086 de la subfamilia A + B formulado a una dosis de 200 µg/ml, cada uno con 0,5 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio en presencia de concentraciones variables de polisorbato 80 (A=0 %, B=0,002 % y C=0,0005 % y D= 0,01 %) y se almacenó a 2-8 °C o 25 °C. Las relaciones molares polisorbato 80:proteína de A, B, C y D son 0, 1,1, 2,7 y 5,3, respectivamente. La potencia de la subfamilia B se analizó a continuación a 0, 7, 14 y 28 días. A cada punto de tiempo se agitaron las muestras como se ha descrito durante 24 horas antes de la prueba.

FIGURA 4

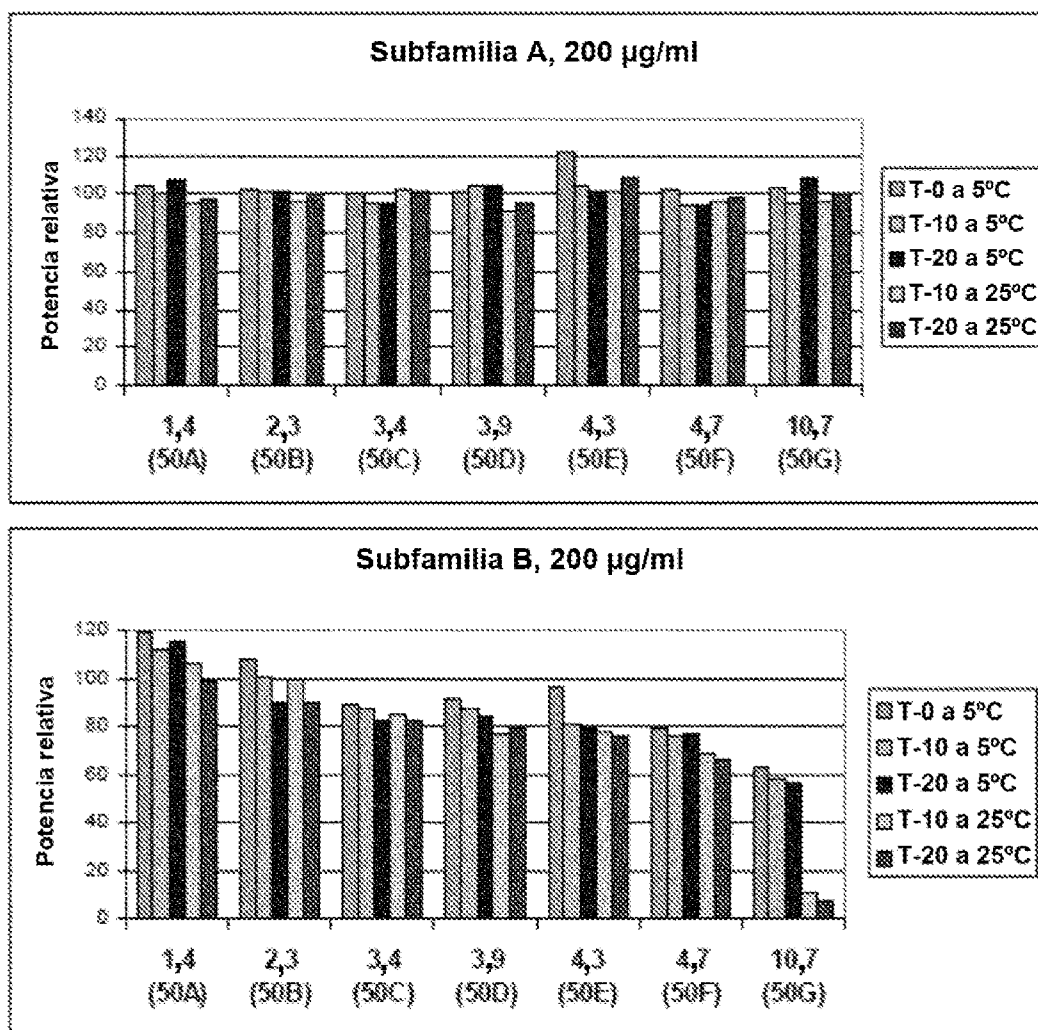
Potencia de la subfamilia B a 20 µg/ml durante 28 días



MnB rLP2086 de la subfamilia A + B formulado a una dosis de 20 µg/ml, cada uno con 0,5 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio en presencia de concentraciones variables de polisorbato 80 (A=0 %, B=0,0005 % y C=0,001 %) y se almacenó a 2-8 °C o 25 °C. Las relaciones molares polisorbato 80:proteína de A, B y C son 0, 2,7 y 5,3, respectivamente. La potencia de la proteína de la subfamilia B se analizó a continuación a 0, 7, 14 y 28 días. A cada punto de tiempo se agitaron las muestras como se ha descrito durante 24 horas antes de la prueba.

Resultados de potencia para 200 µg/ml con diferentes proporciones molares

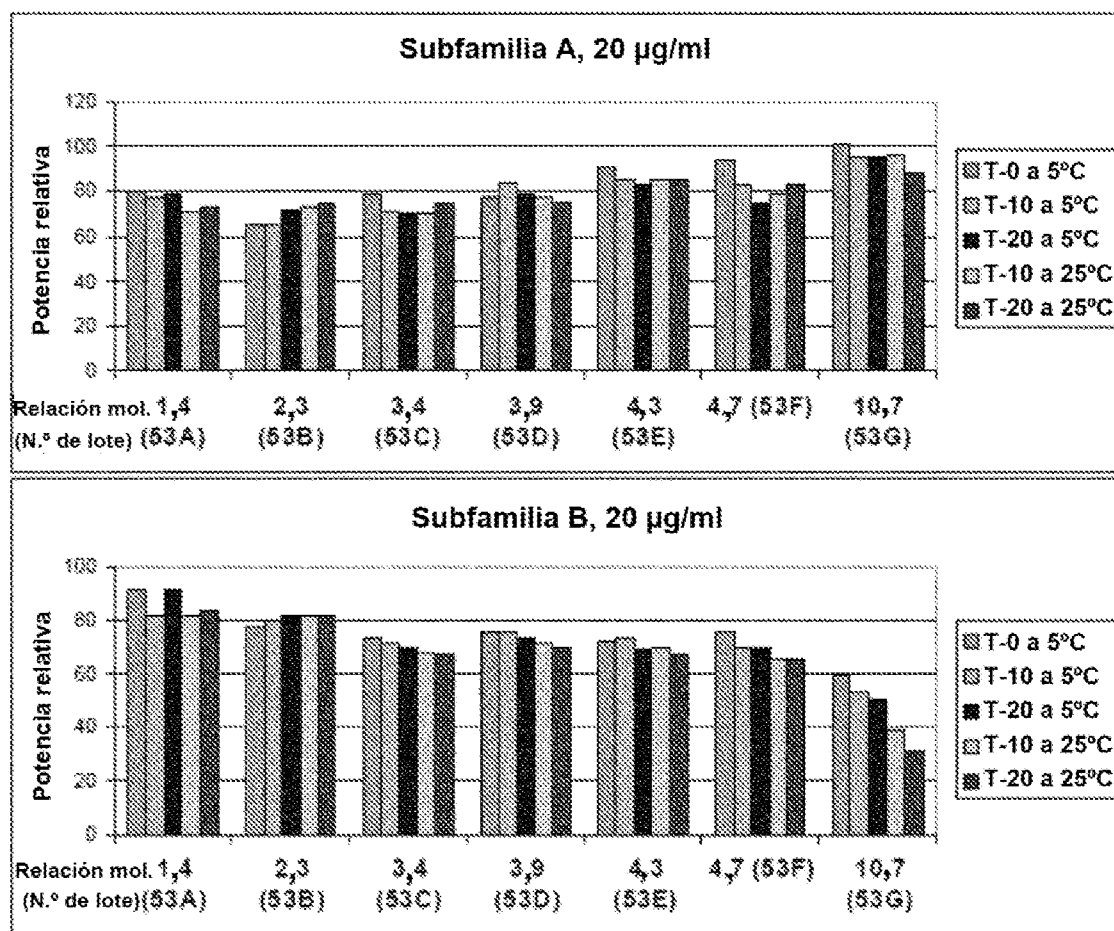
FIGURA 5



MnB rLP2086 de la subfamilia A + B se formuló a 200 µg/ml con relaciones molares de polisorbato 80:proteína 1,4, 2,3, 3,4, 3,9, 4,3, 4,7, 10,7 para los lotes 50A, 50B, 50C, 50D, 50E, 50F, 50G, respectivamente. T-0, T-10 y T-20 representan el tiempo cero, 10 y 20 días, respectivamente. El gráfico superior corresponde a los resultados de potencia para la subfamilia A y el gráfico inferior corresponde a los resultados de potencia para la proteína de la subfamilia B. A cada punto de tiempo se agitaron las muestras como se ha descrito durante 24 horas antes de la prueba.

Resultados de potencia para 20 µg/ml con diferentes proporciones molares

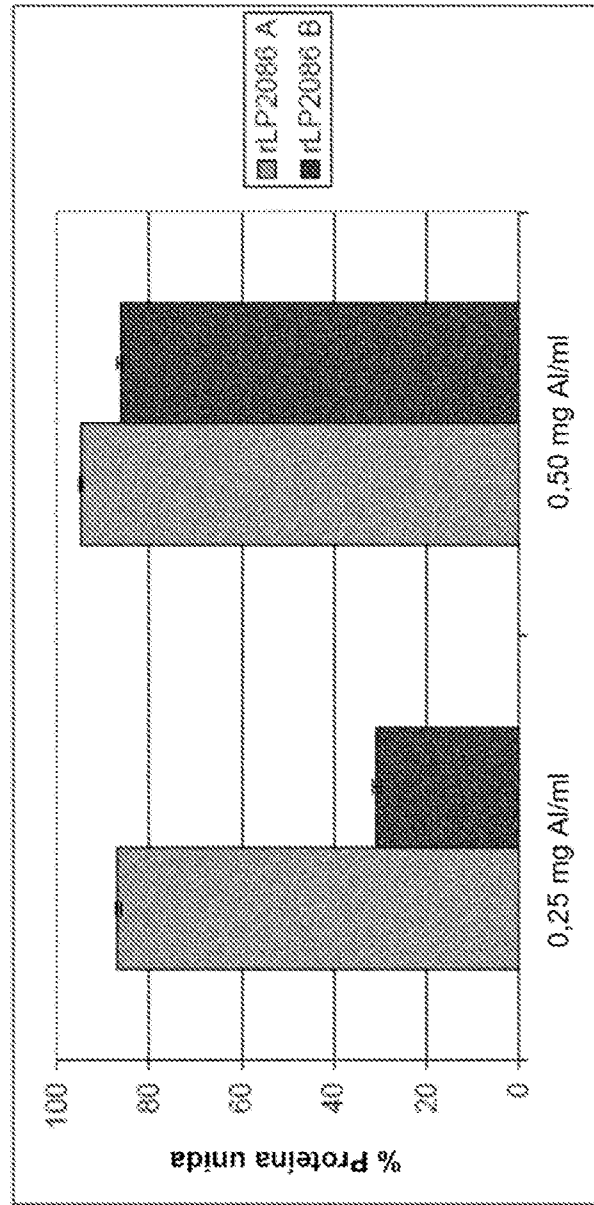
FIGURA 6



MnB rLP2086 de la subfamilia A + B se formuló a 20 µg/ml con relaciones molares de polisorbato 80:proteína 1,4, 2,3, 3,4, 3,9, 4,3, 4,7, 10,7 para los lotes 53A, 53B, 53C, 53D, 53E, 53F, 53G, respectivamente. T-0, T-10 y T-20 representan el tiempo cero, 10 y 20 días, respectivamente. El gráfico superior corresponde a los resultados de potencia para la subfamilia A y el gráfico inferior corresponde a los resultados de potencia para la proteína de la subfamilia B. A cada punto de tiempo se agitaron las muestras como se ha descrito durante 24 horas antes de la prueba.

FIGURA 7

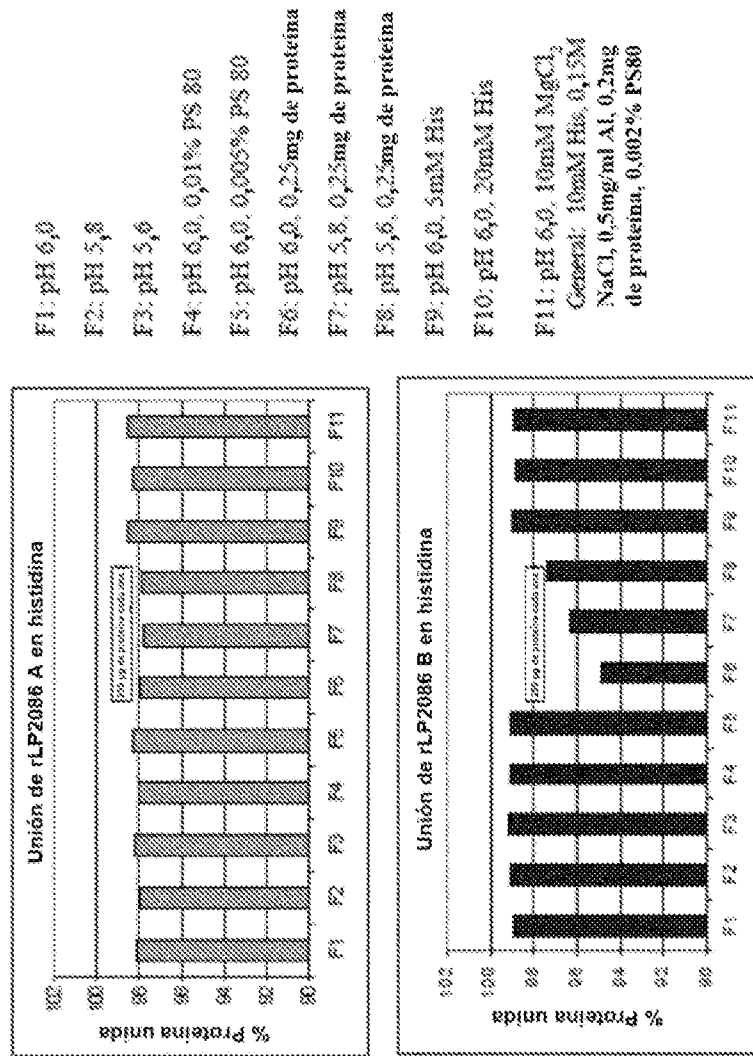
Unión de proteína a fosfato de aluminio a pH 6,5



MnB rLP2086 de la subfamilia A + B se formuló a 400 µg/ml en tampón de histidina 10 mM con NaCl 150 mM y a una concentración de POLISORBATO 80 a 0,02 % a pH 6,5. El eje X representa el contenido de aluminio en la formulación y el eje Y es el porcentaje de proteína unida medido mediante el ensayo de IEX HPLC.

FIGURA 9

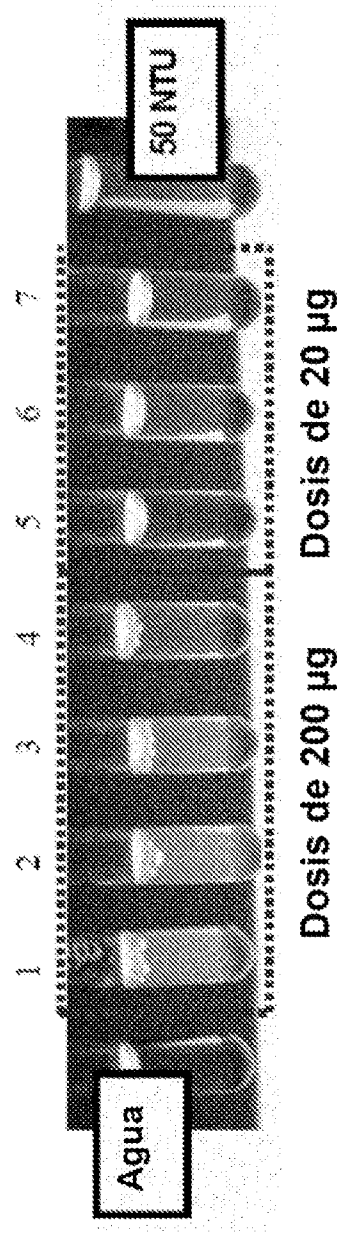
Efecto del pH, el tampón y la concentración de proteína sobre la unión de rLP2086 de la subfamilia A y B



Once formulaciones de las formulaciones MnB de la subfamilia A + B con proteínas de la subfamilia A + B se formularon a 200 µg/ml cada una con 0,5 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio en tampón de histidina 10 mM con NaCl 150 mM y 0,02 % de PS80 con pH variable (F1 a F3 con 200 µg/ml de cada proteína y 0,02 % de Polisorbato 80); variando las concentraciones de polisorbato de polisorbato 80 de 0,01 % a 0,05 % (F4-F5); variando la concentración de proteínas a 250 µg/ml para cada proteína de la subfamilia (F6-F8), variando la concentración del tampón de histidina 5 mM A 20 mM (F9 y F10); MgCl₂ 10 mM adicional (F11).

FIGURA 10

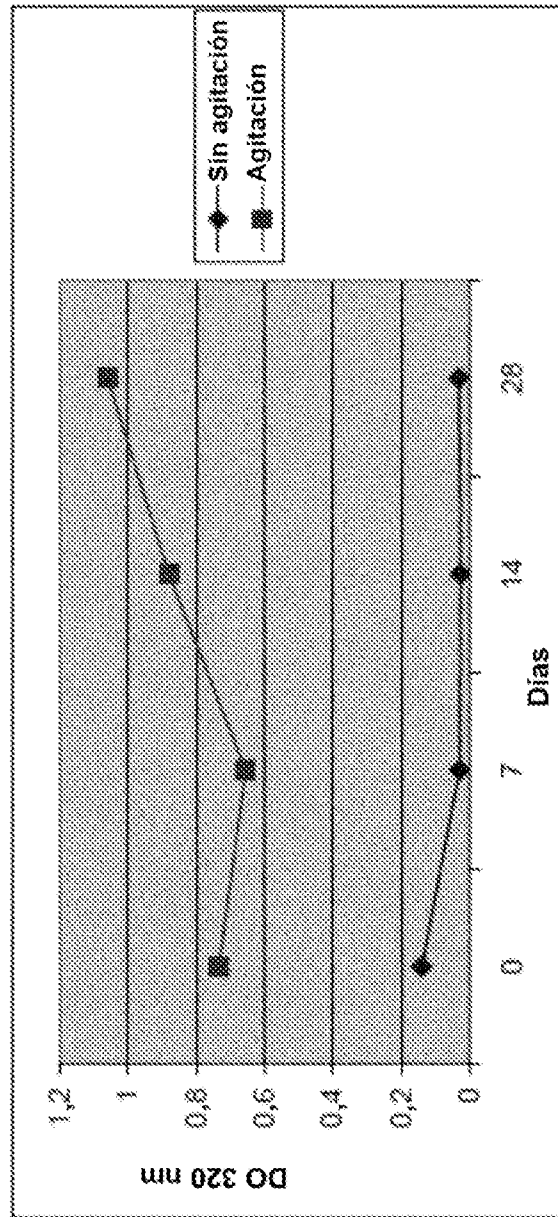
Aspecto visual de formulaciones rLP2086 sin fosfato de aluminio



Fotografía de dos formulaciones de proteínas rLP2086 A + B a 200 (izquierda) y 20 (derecha) µg/ml sin fosfato de aluminio con concentraciones variables de polisorbato 80, expresadas como un porcentaje, indicadas en la parte superior (1 = 0 %, 2 = 0,002 %, 3 = 0,005 %, 4 = 0,01 %, 5 = 0 %, 6 = 0,0005 %, 7 = 0,001 %). Todos los tubos se incubaron a 5 °C durante 14 días y se agitaron durante 24 horas antes del ensayo. Se incluyeron agua y 50 UTN (unidades de turbidez nefelométrica) del patrón de turbidez para comparación visual en cada extremo; el agua mostraba claridad y 50 UTN mostraban el aspecto de una solución turbia. Nota: también se obtuvieron resultados similares tras la incubación durante 1, 7 y 28 días.

FIGURA 11

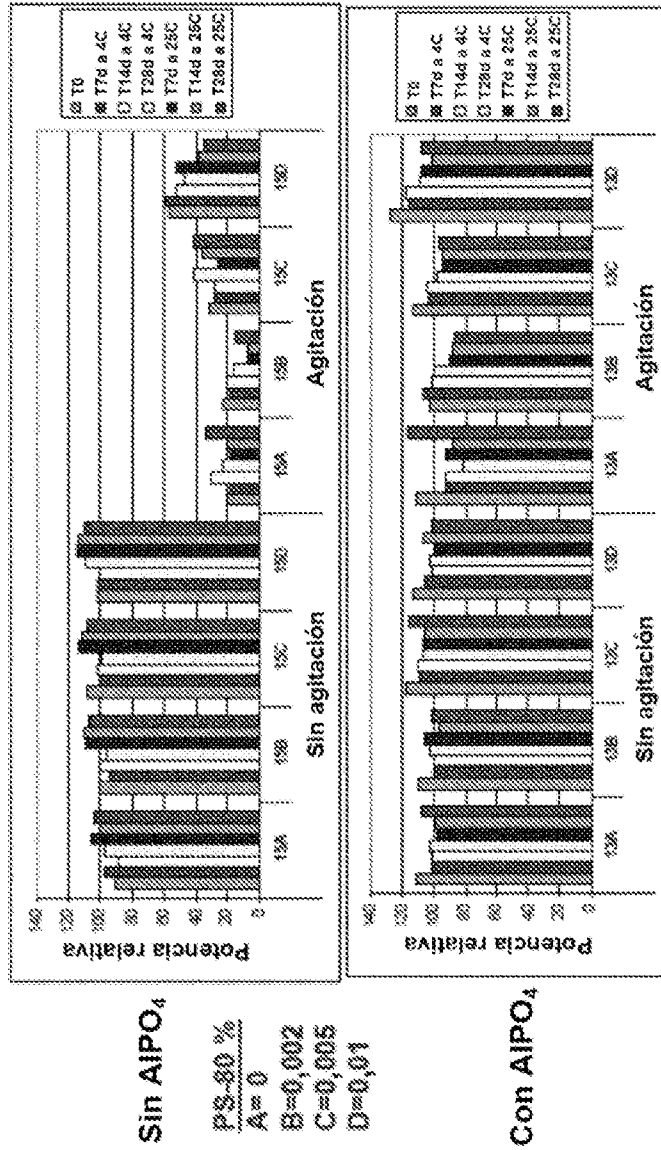
Mediciones de DO del aspecto de las muestras, 2-8°C



Mediciones de la densidad óptica de muestras de formulaciones sin fosfato de aluminio a $\lambda=320$ nm para la formulación de rLP2086 de 200 µg/ml, designación a 15C (0,005 % de polisorbato 80) durante un mes a 5 °C. Las muestras agitadas se indican en cuadrados rojos y las muestras no agitadas se indican en rombos azules.

FIGURA 12

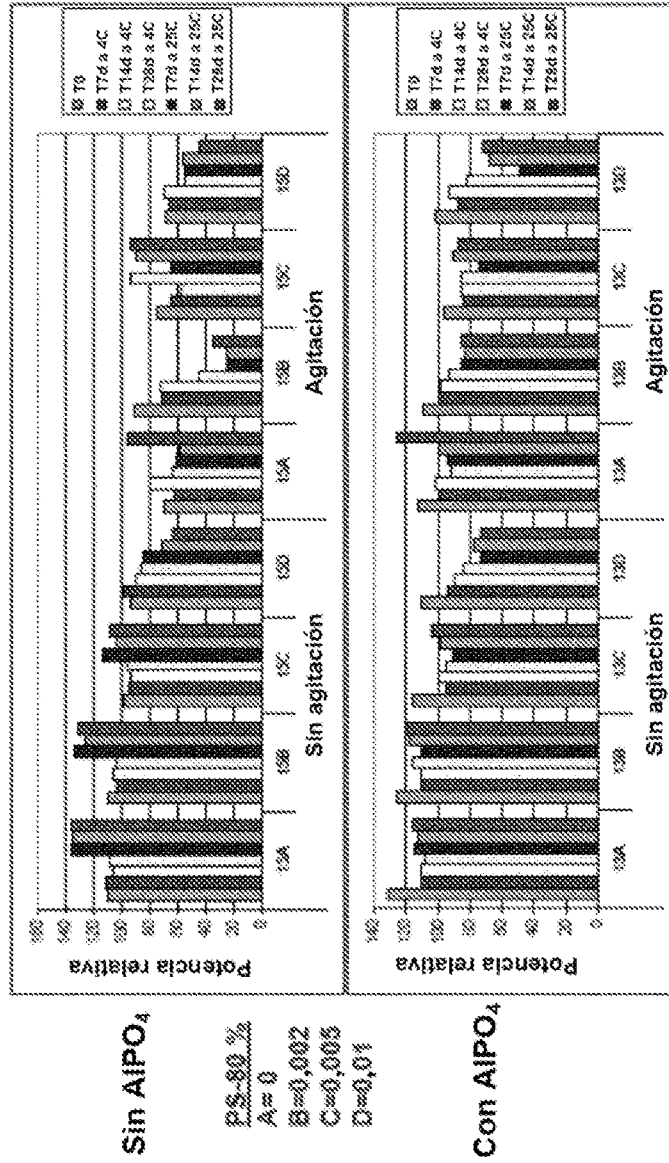
Resultados de potencia para la subfamilia A para la formulación con y sin AlPO_4



MnB rLP2086 de la subfamilia A + B formulada a 200 µg/ml de cada subfamilia. Las formulaciones se realizaron en solución salina tamponada con histidina con y sin AlPO_4 y con niveles variables de polisorbato 80. El gráfico superior representa la formulación sin AlPO_4 y el gráfico inferior representa formulaciones con 0,5 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio. Cuatro grupos de la mitad izquierda del gráfico representan ausencia de agitación y los otros cuatro grupos de la derecha representan la agitación marcada sobre el eje X en la parte inferior de cada gráfico. El eje Y representa el porcentaje de potencia relativa. Las concentraciones de polisorbato 80 en las formulaciones finales son 0 %, 0,0005 %, 0,001 %, y 0,01 % para el lote 15A o 13A, 15B o 13B, 15C o 13C, y 15D o 13D, respectivamente. Las muestras se almacenaron 2-8 °C y and 25 °C T0, T7d, T14d y T28d representan el tiempo cero, 7, 14 y 28 días. Cada barra representa cada dato de punto de tiempo.

FIGURA 13

Resultados de potencia para la subfamilia B para la formulación con y sin AlPO_4



MnB rLP2086 de la subfamilia A + B formulada a 200 $\mu\text{g/ml}$ de cada subfamilia. Las formulaciones se realizaron en solución salina tamponada con histidina con y sin AlPO_4 y con niveles variables de polisorbato 80. El gráfico superior representa la formulación sin AlPO_4 y el gráfico inferior representa formulaciones con 0,5 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio. Cuatro grupos de la mitad izquierda del gráfico representan ausencia de agitación y los otros cuatro grupos de la derecha representan la agitación marcada sobre el eje X en la parte inferior de cada gráfico. El eje Y representa el porcentaje de potencia relativa. Las concentraciones de polisorbato 80 en las formulaciones finales son 0 %, 0,0005 %, 0,001 % y 0,01 % para el lote 15A o 13A, 15B o 13B, 15C o 13C, y 15D o 13D, respectivamente. Las relaciones molares correspondientes de polisorbato 80:proteína para estas concentraciones de polisorbato 80 son 0, 1,1, 2,7 y 5,3, respectivamente. Las muestras se almacenaron a 2-8 °C y and 25 °C. T0, T7d, T14d y T28d representan el tiempo cero, 7, 14 y 28 días. Cada barra representa cada dato de punto de tiempo.

FIGURA 14

Resultados de Polisorbato 80 en rLP2086 placebo con 0,5 mg/ml de aluminio

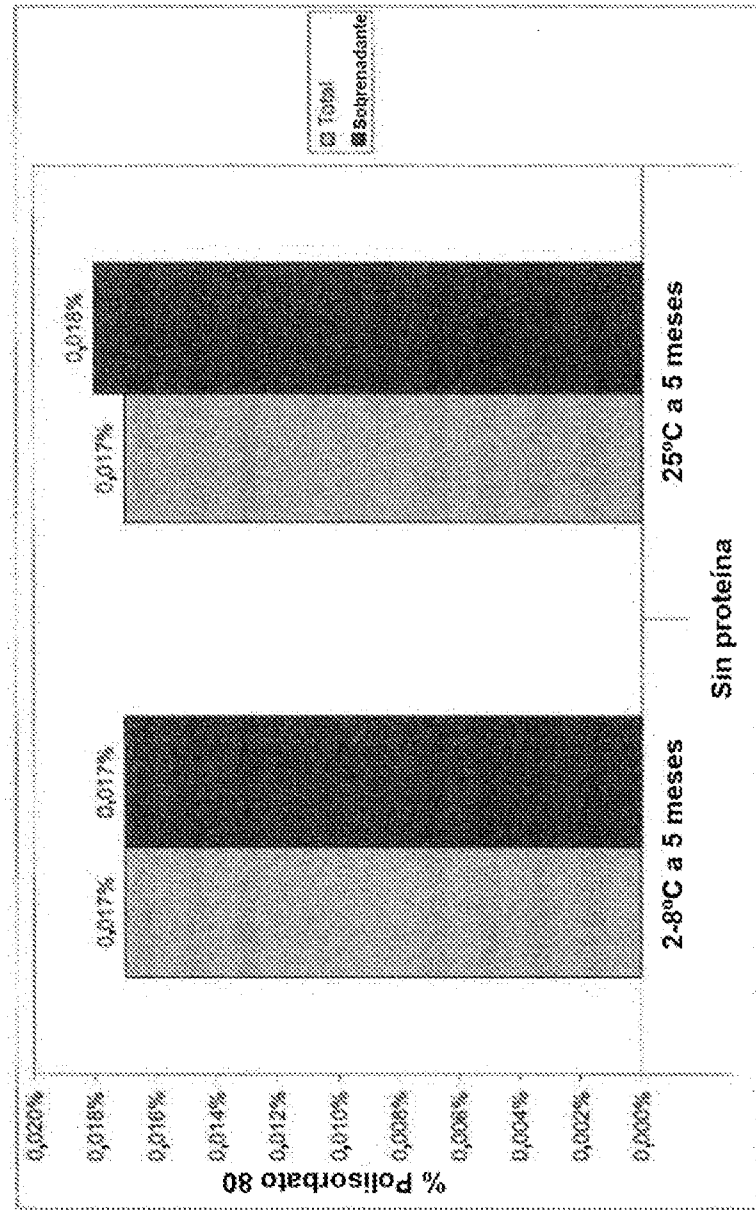


FIGURA 15

Resultados de Polisorbato 80 para la subfamilia A

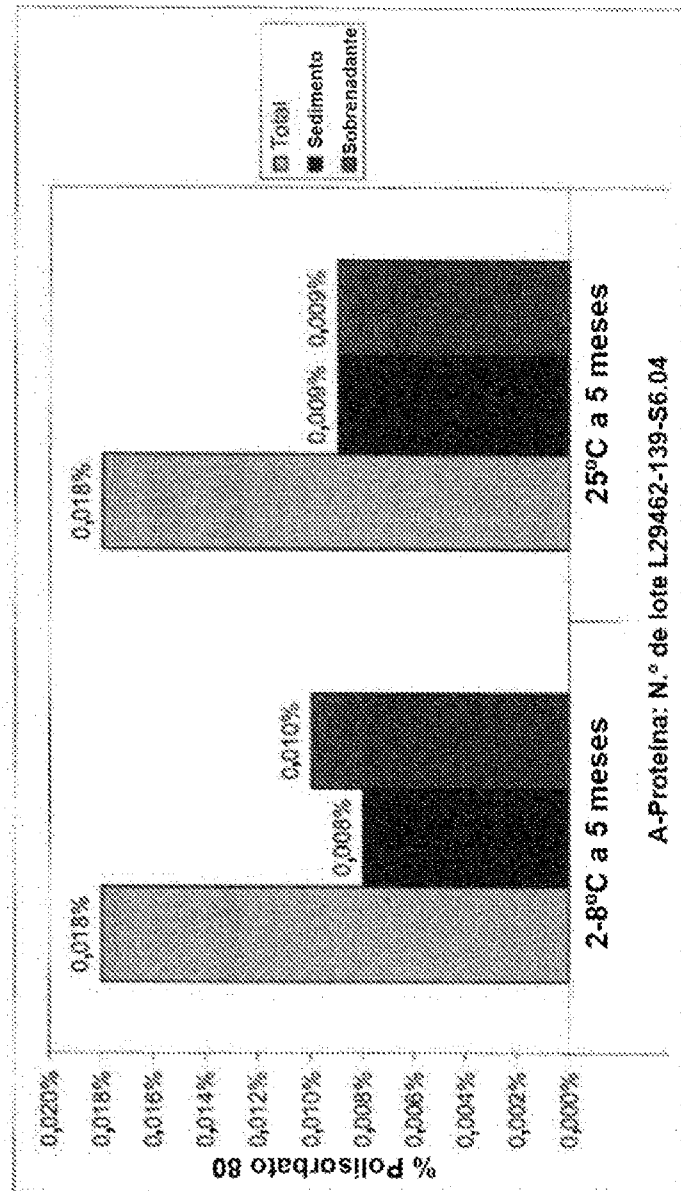


FIGURA 16

Resultados de Polisorbato 80 para la subfamilia B

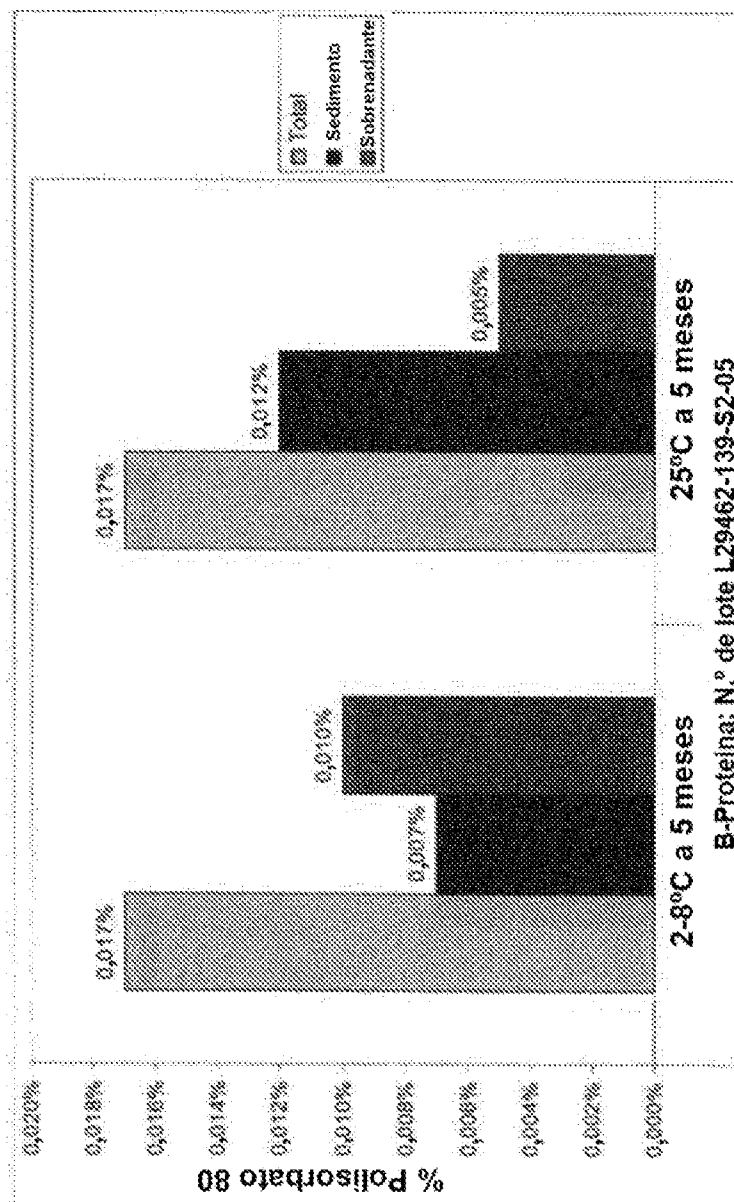


FIGURA 17

Correlación entre la potencia y la proporción molar de unidades para la subfamilia B

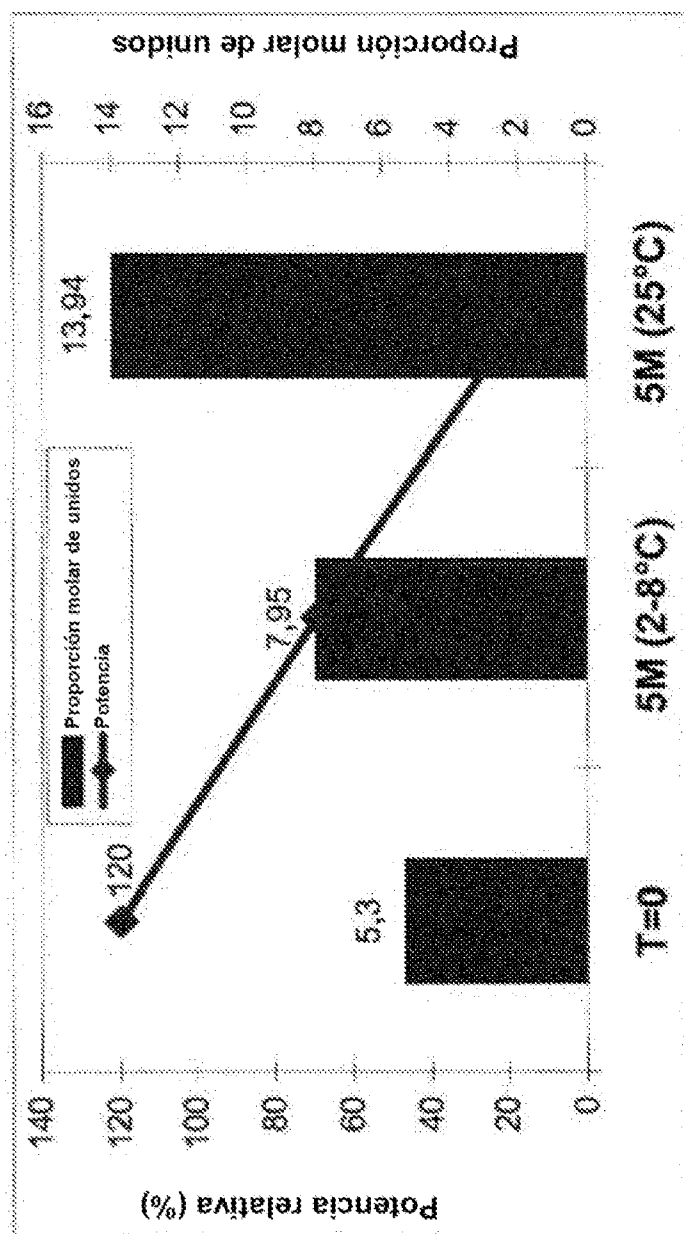


FIGURA 18

Resultados de la proporción molar para la subfamilia A

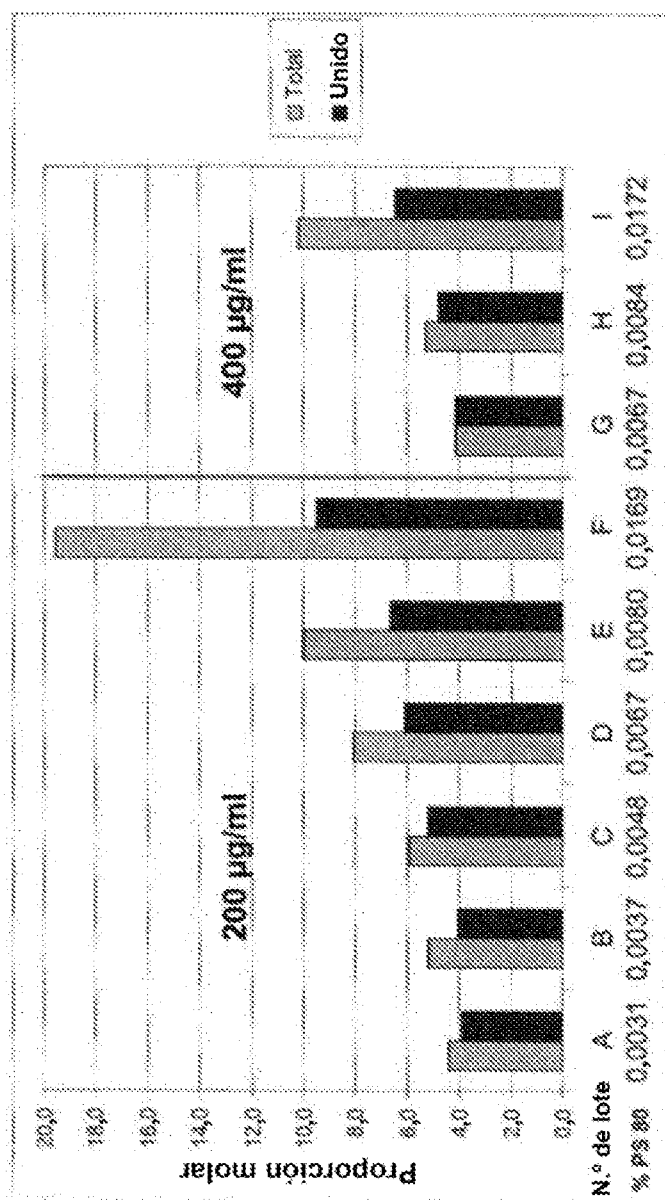


FIGURA 19

Resultados de la proporción molar para la subfamilia B

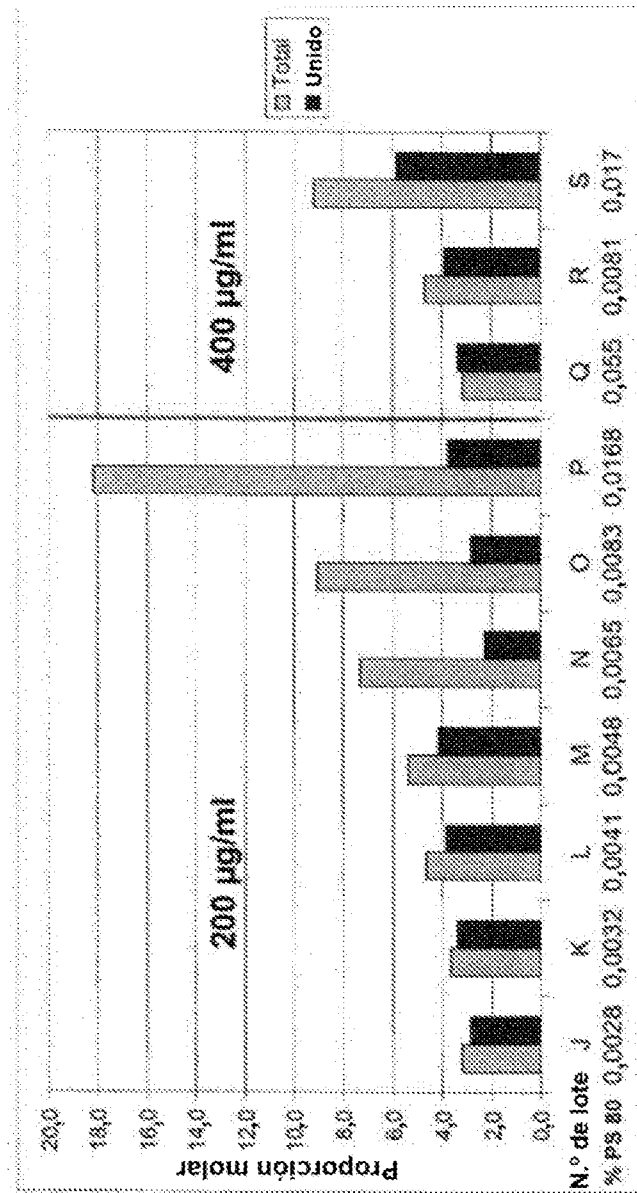


FIGURA 20

Resultados de la proporción molar para formulaciones de rLP2086 a 400 µg/ml

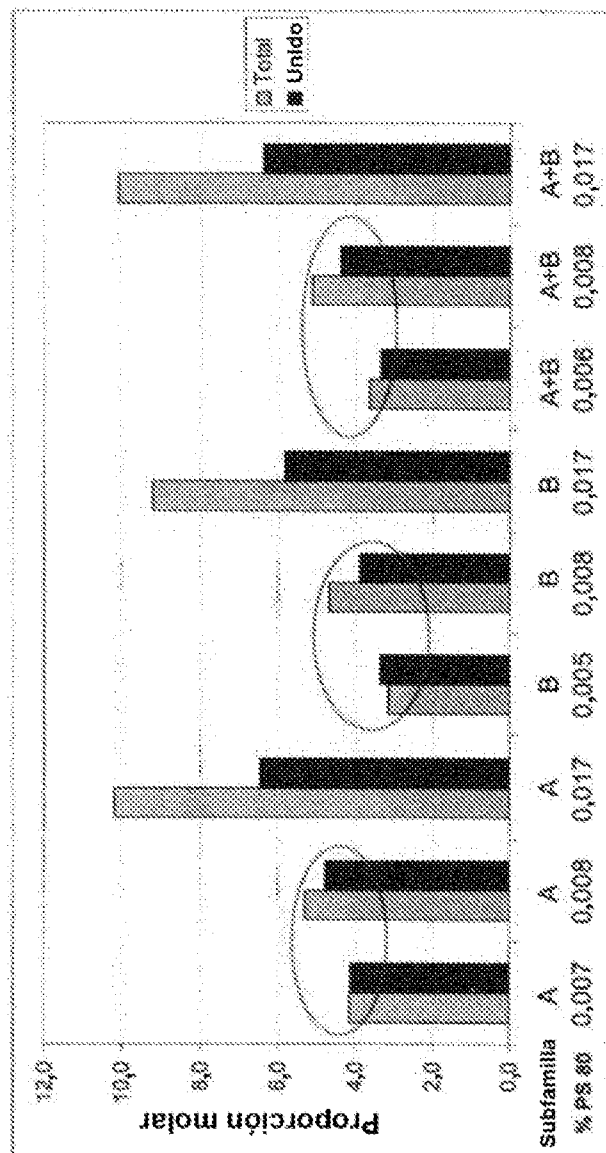


FIGURA 21

Resultados de Polisorbato 80 para el producto farmacológico rLP2086 a diferentes puntos de tiempo

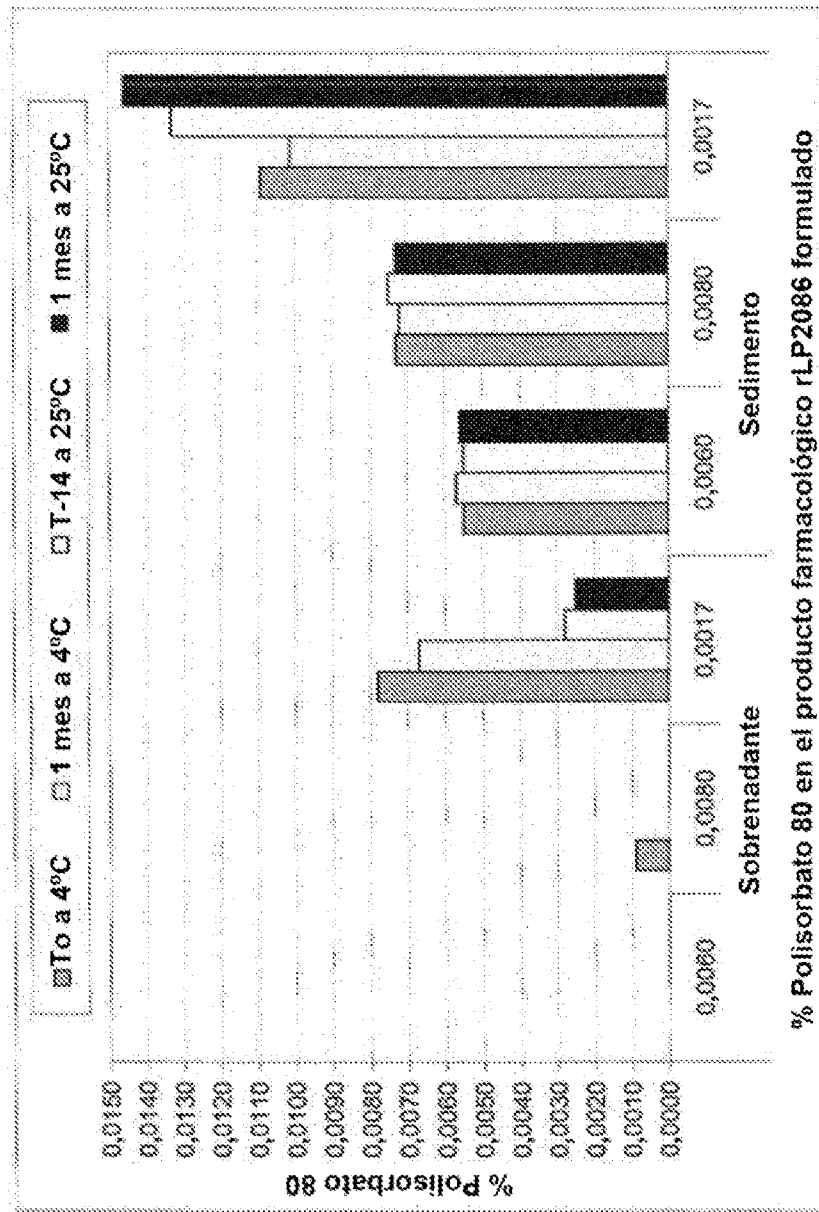


FIGURA 22

Resultados de la proporción molar de unidos para el producto farmacológico r1.P2086 a diferentes puntos de tiempo

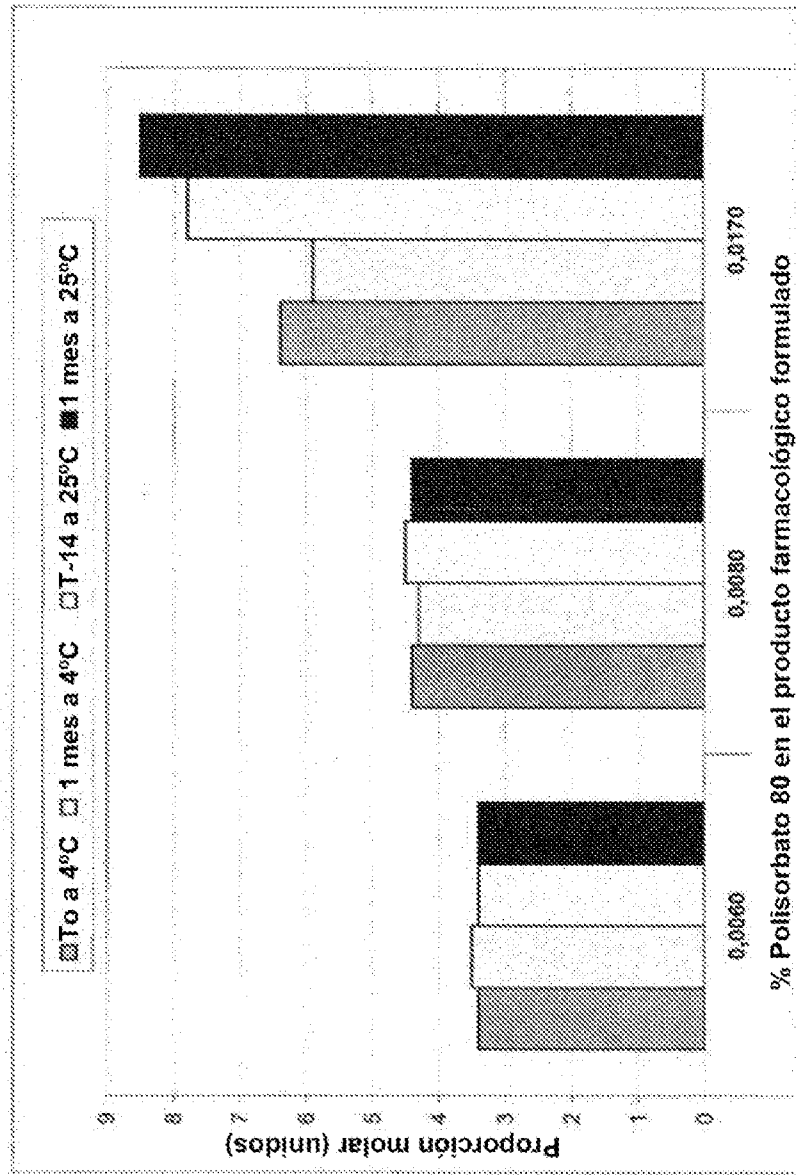


FIGURA 23

Potencia y resultados de la proporción molar de unidades para la subfamilia A

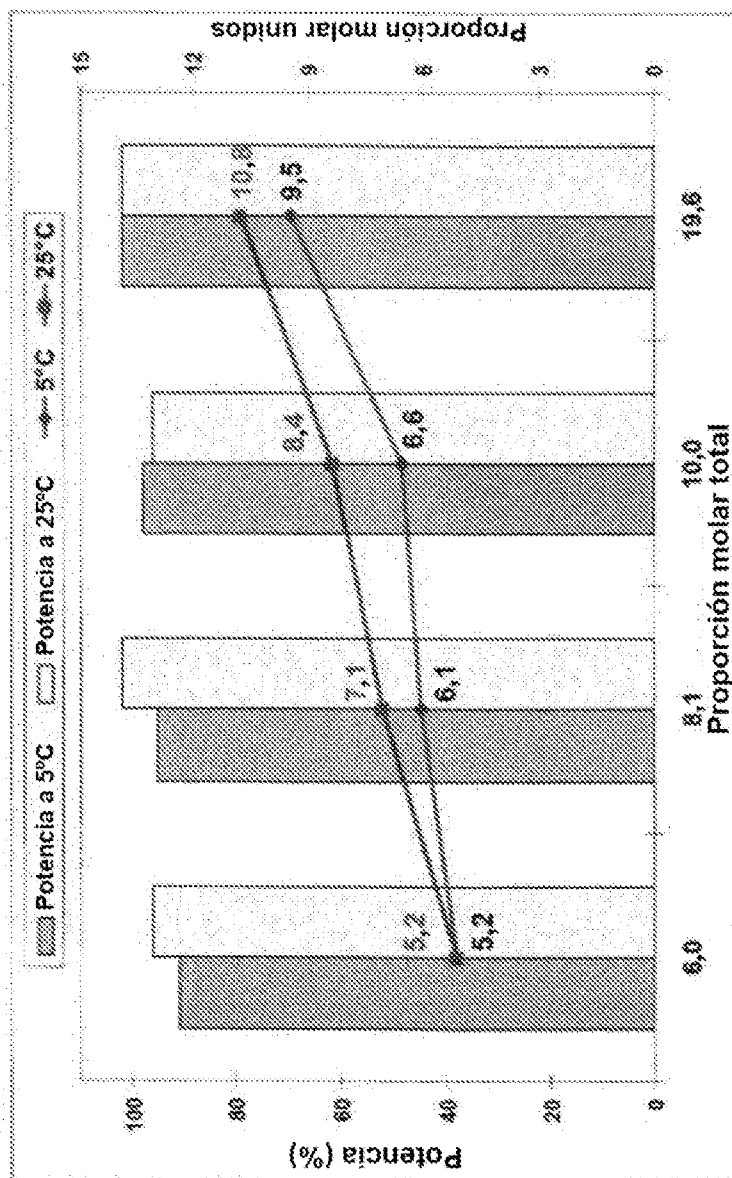


FIGURA 24

Potencia y resultados de la proporción molar de unidades para la subfamilia B

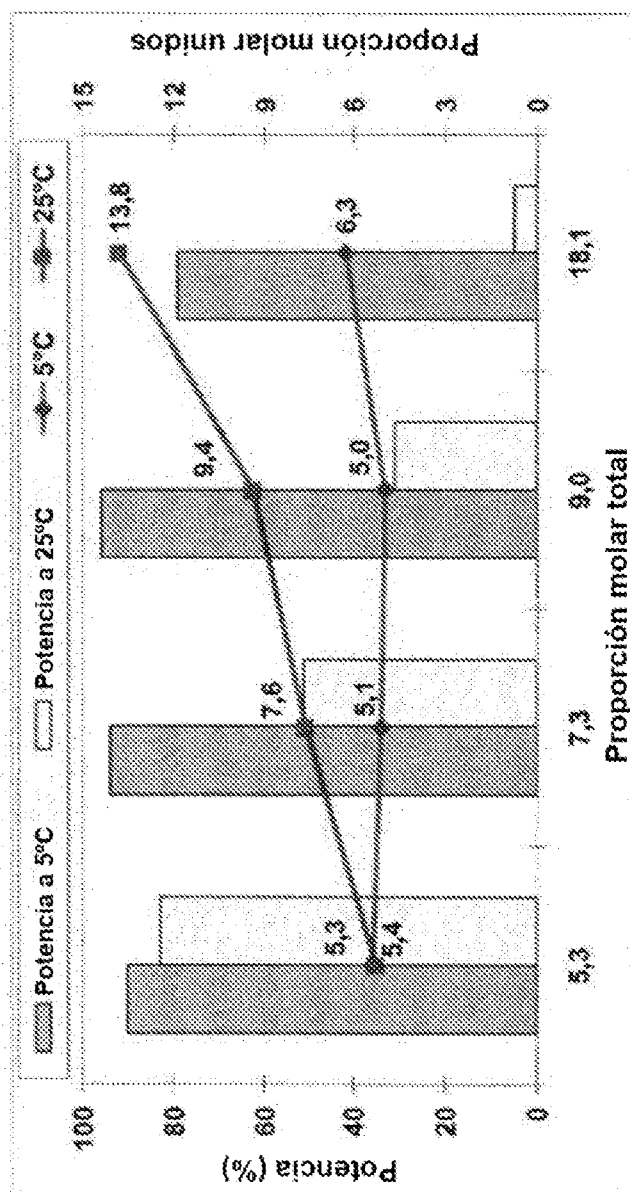
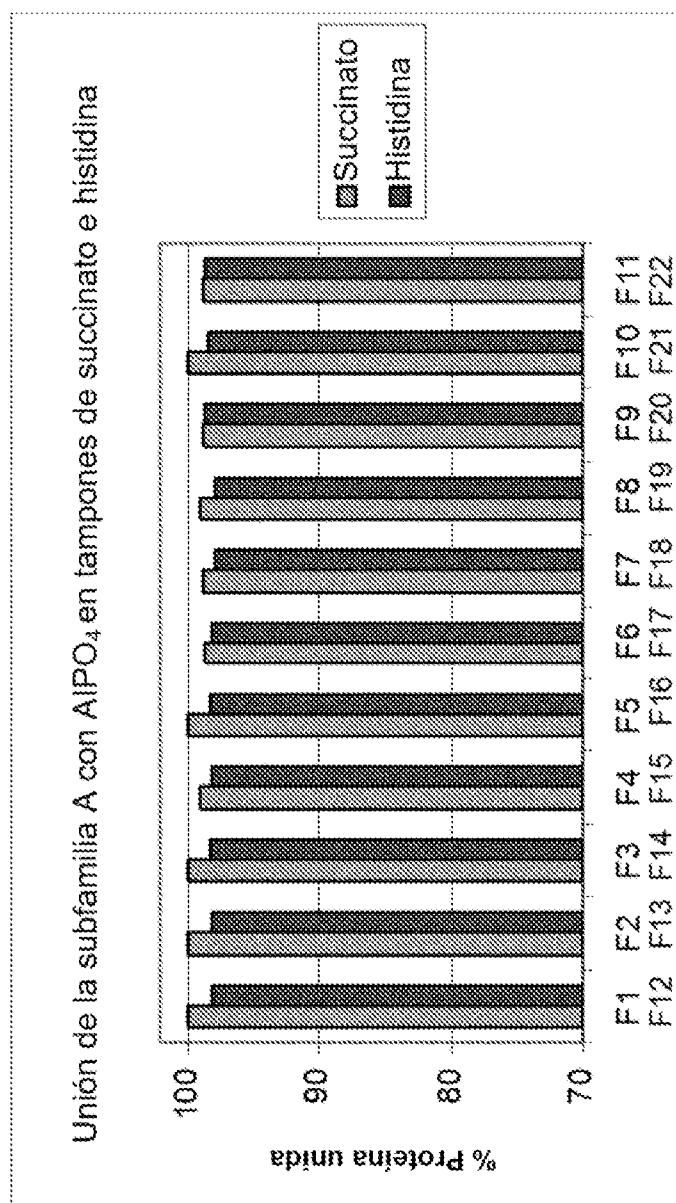
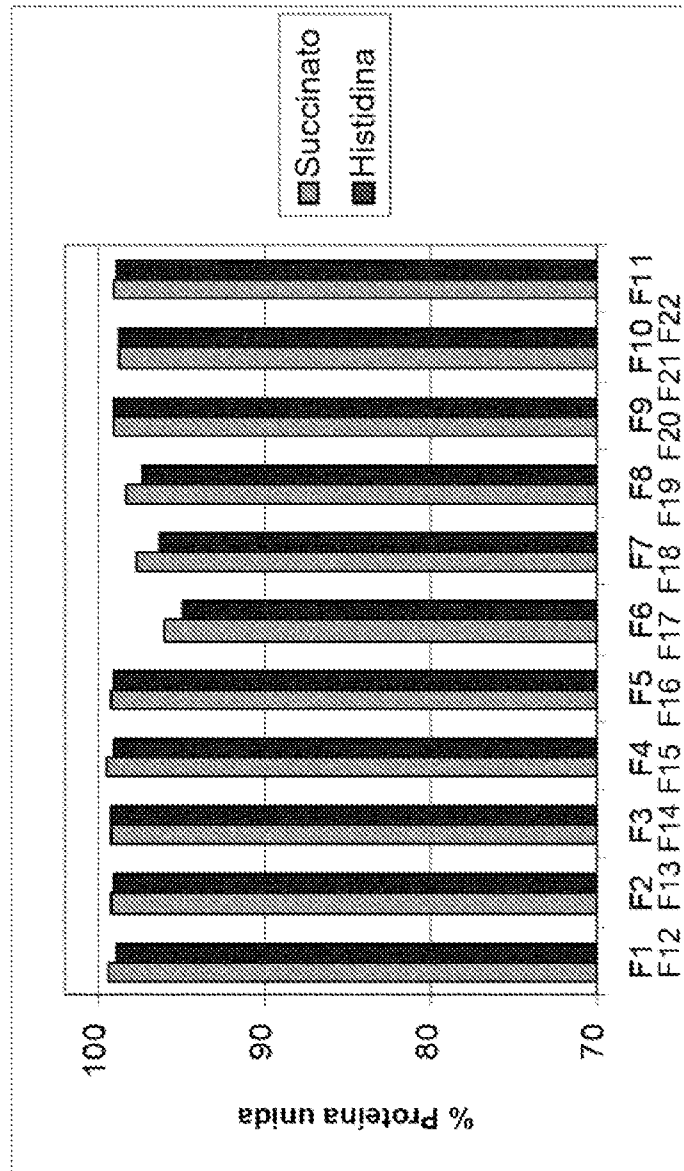


FIGURA 25

Unión de la proteína de la subfamilia A de formulaciones, de formulaciones MnB bivalentes formuladas a 200 mg/ml de cada proteína con 0,5 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio en tampón de histidina 10 mM con NaCl 150 mM y 0,02 % de PS80 con pH variable (F1 a F3 con 200 mg/ml de cada proteína y 0,02 % de PS80); variando las concentraciones de polisorbato de PS80 de 0,01 a 0,05 (F4-F5); variando la concentración de proteínas a 250 mg/ml (F6-F8), variando la concentración del tampón de histidina 5 mM a 20 mM (F9 y F10); MgCl2 10 mM adicional (F11).

FIGURA 26

Unión de la subfamilia B con AlPO_4 en tampones de succinato e histidina



Unión de la proteína de la subfamilia B de formulaciones, de formulaciones MnB bivalentes formuladas a 200 mg/ml de cada proteína con 0,5 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio en tampón de histidina 10 mM con NaCl 150 mM y 0,02 % de PS80 con pH variable (F1 a F3 con 200 mg/ml de cada proteína y 0,02 % de PS80); variando las concentraciones de polisorbato de PS80 de 0,01 a 0,05 (F4-F5); variando la concentración de proteínas a 250 mg/ml (F6-F8), variando la concentración del tampón de histidina 5 mM a 20 mM (F9 y F10); MgCl2 10 mM adicional (F11).

FIGURA 27

Comparación de la unión en tampón de succinato, histidina y fosfato

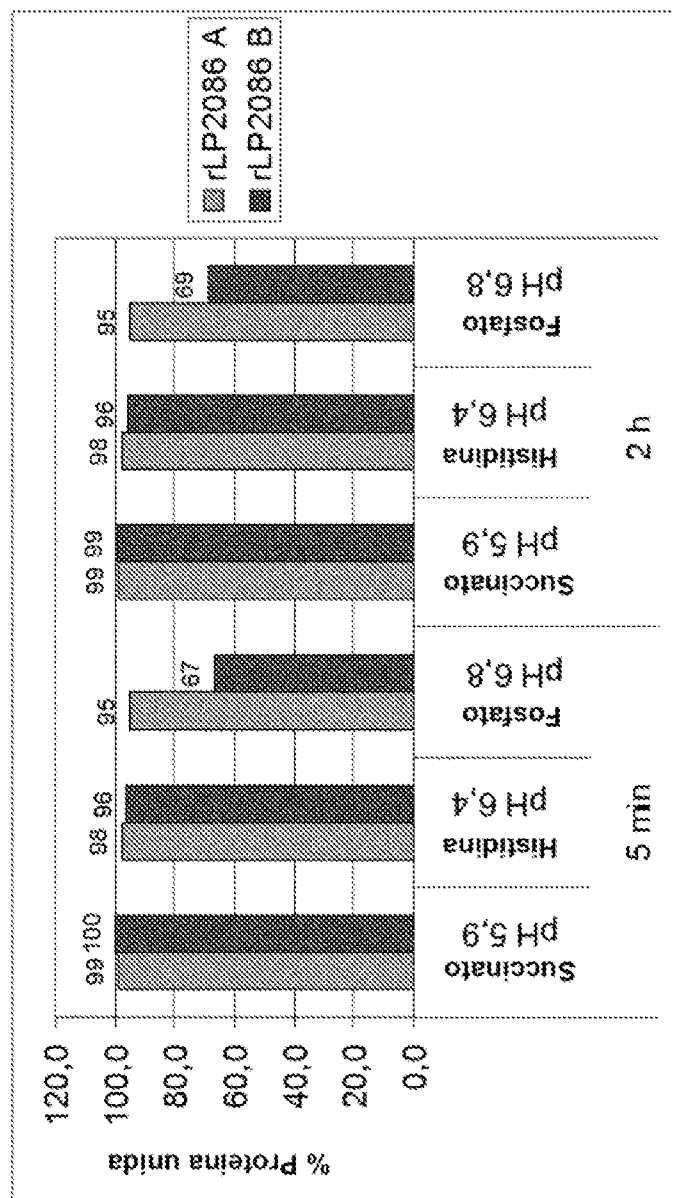


FIGURA 28

Unión dependiente de pH de la subfamilia A con AlPO_4

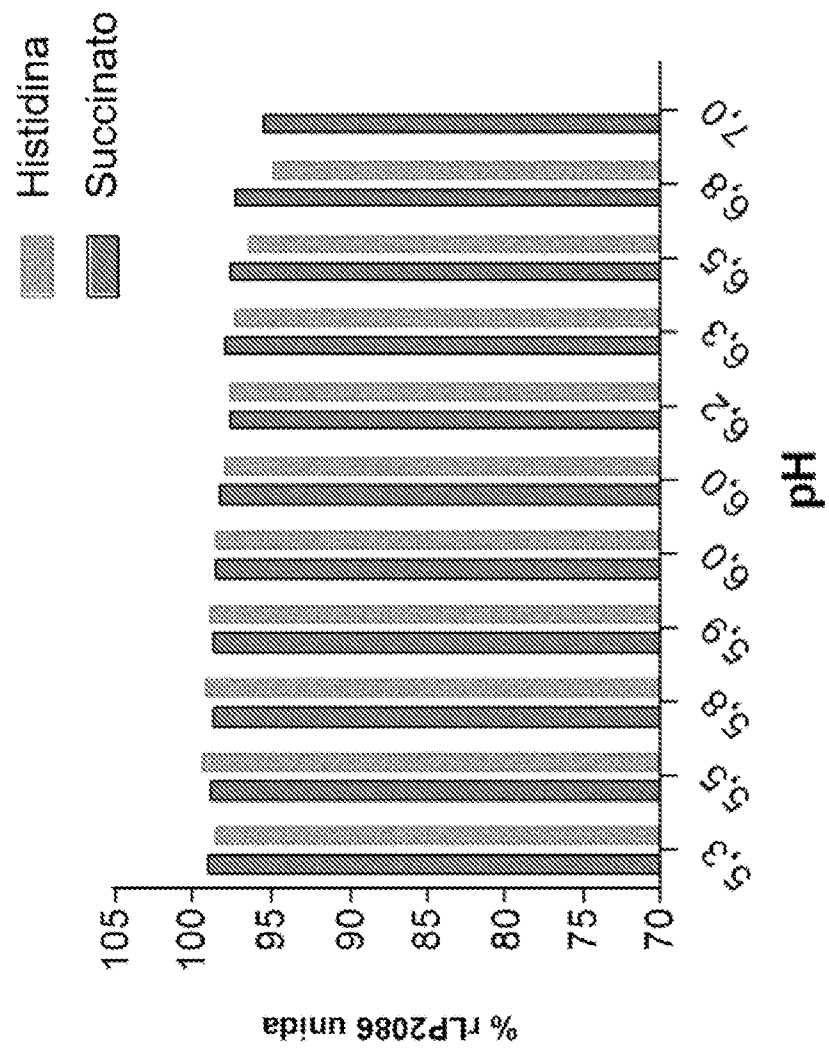


FIGURA 29