



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 059**

51 Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05740675 .3**
96 Fecha de presentación : **29.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1755662**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Conjugados meningocócicos combinados con una proteína transportadora común.**

30 Prioridad: **30.04.2004 GB 0409745**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.11.2009

73 Titular/es:
Novartis Vaccines and Diagnostics S.R.L.
Via Fiorentina 1
53100 Siena, SI, IT

72 Inventor/es: **Costantino, Paulo**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conjugados meningocócicos combinados con una proteína transportadora común.

5 **Campo técnico**

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

10 **Técnica antecedente**

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

Está disponible una vacuna bivalente de polisacáridos capsulares de los serogrupos A + C como el producto Mencevax ACTM y están disponibles mezclas tetravalentes de los sacáridos de serogrupos A + C + Y + W135 como los productos Mencevax ACWYTM y MenomuneTM [1-3]. Aunque eficaces en adolescentes y adultos, estas vacunas inducen una respuesta inmune escasa y una corta duración de la protección debido a que los polisacáridos no conjugados son antígenos independientes de células T que inducen una débil respuesta inmune que no puede reforzarse.

Para abordar la escasa inmunidad de los sacáridos capsulares, se han desarrollado vacunas conjugadas en las que los sacáridos se unen a proteínas transportadoras. Se han autorizado para uso en seres humanos vacunas conjugadas contra el serogrupo C e incluyen MenjugateTM [4], MeningitecTM y NeisVac-CTM. También se han ensayado mezclas de conjugados de los serogrupos A + C [5, 6] y se han descrito mezclas de conjugados de los serogrupos A + C + W135 + Y [7, 10].

Aunque las vacunas conjugadas mixtas son similares a las vacunas de sacáridos mixtas, existen algunas diferencias claves. En particular, la inclusión de una proteína transportadora en las mezclas conjugadas presenta nuevos riesgos, particularmente en términos de supresión epitópica inducida por transportador (o “supresión por transportador”, como se conoce generalmente) es decir, el fenómeno por el que la inmunización de un animal con una proteína transportadora impide que ese animal genere después una respuesta inmune contra un epítipo antigénico que se presente en ese transportador [11]. Esta cuestión es particularmente preocupante cuando se administran simultáneamente múltiples conjugados con la misma proteína transportadora [12].

Se ha investigado la supresión por transportador para conjugados meningocócicos monovalentes [13], y ha habido algunos trabajos en relación con conjugados meningocócicos mixtos. Por ejemplo, la referencia 14 sugiere que deberían usarse fimbrias de *Bordetella pertussis* como transportador para evitar la supresión por transportador en vacunas conjugadas multivalentes y la referencia 15 sugiere que la supresión por transportador debería resolverse usando más de un tipo de proteína transportadora en la vacuna, prefiriéndose proteína D de *H. influenzae* y/o toxoide tetánico (Tt).

Un objetivo de la invención es proporcionar vacunas adicionales que comprendan sacáridos capsulares conjugados de múltiples serogrupos meningocócicos pero que eviten el riesgo de supresión epitópica inducida por transportador.

Descripción de la invención

Al contrario que la estrategia sugerida en la referencia 15 para evitar la supresión por transportador, en concreto el uso de más de un tipo de proteína transportadora diferente, la invención usa el mismo tipo de proteína transportadora (un “transportador común”) para múltiples conjugados, que simplifica la fabricación de la vacuna a escala comercial. Por selección de un transportador común, sin embargo, se aumenta el potencial de supresión por transportador. Las vacunas se preparan generalmente por mezcla de conjugados individuales que se han preparado en volúmenes concentrados separados, y cada volumen incluirá habitualmente una cantidad residual de proteína transportadora no conjugada a partir de la reacción de conjugación. El transportador no conjugado puede dar origen a supresión por transportador, y si cada volumen concentrado incluye una cantidad x de transportador no conjugado, entonces una mezcla tetravalente incluirá transportador no conjugado $4x$. Cuando se observa supresión por transportador sólo cuando está presente un umbral particular de transportador (por ejemplo, solamente cuando el nivel de transportador no conjugado es lo bastante elevado para saturar las células B y/o células T pertinentes, o sólo cuando es lo bastante elevado para estimular las células T supresoras pertinentes) entonces el nivel $4x$ puede dar como resultado supresión incluso cuando el nivel de cada conjugado individual esté por debajo del umbral y no causaría supresión si se administrara en solitario.

La selección de un transportador común para vacunas multivalentes aumenta por lo tanto significativamente los riesgos de supresión por transportador en comparación con la vacuna monovalente o cuando se compara con conjugados que usan diferentes proteínas transportadoras. Para compensar este riesgo aumentado, la invención controla la cantidad de proteína transportadora no conjugada en una vacuna. Mientras que el potencial para la supresión por transportador se aborda en las referencias 13 a 15 centrándose en la naturaleza de la proteína o proteínas transpor-

tadoras usadas para los sacáridos meningocócicos, la invención se centra en su lugar en la cantidad de la proteína transportadora que se usa y, más particularmente, en la cantidad que está presente en una forma no conjugada. Minimizando la cantidad de proteína transportadora no conjugada en una vacuna puede evitarse entonces la supresión por transportador, incluso cuando se usa un transportador común.

La inclusión de proteína transportadora no conjugada en vacunas conjugadas se ha considerado anteriormente [16], pero la concentración de proteína transportadora no conjugada (toxóide tetánico) en este trabajo anterior era de aproximadamente 10 Lf/dosis. Con una dosis de 0,5 ml y usando un factor de conversión de 1 Lf = 3 μ g [12], estas vacunas contenían aproximadamente 60 μ g/ml de proteína transportadora no conjugada. La referencia 16 no se preocupaba de evitar la supresión por transportador.

Por lo tanto, la invención proporciona una composición para inmunizar a un paciente contra una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis*, que comprende al menos dos de: (a) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* de serogrupo A y (ii) una proteína transportadora; (b) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* de serogrupo C y (ii) una proteína transportadora; (c) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* de serogrupo W135 y (ii) una proteína transportadora; (d) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* de serogrupo Y y (ii) una proteína transportadora, *caracterizada porque* (1) al menos dos de dichos conjugados (a), (b), (c) y (d) usan la misma proteína transportadora ("el transportador común") y (2) la composición incluye el transportador común en una forma no conjugada, siendo la concentración del transportador común no conjugado menor de 10 μ g/ml.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición para inmunizar a un paciente contra una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis*, que comprende las etapas de:

(1) preparar al menos dos de: (a) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A y (ii) una proteína transportadora; (b) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C y (ii) una proteína transportadora; (c) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) una proteína transportadora; (d) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y y (ii) una proteína transportadora, donde al menos dos de dichos conjugados (a), (b), (c) y (d) usan la misma proteína transportadora ("el transportador común"); y

(2) mezclar los al menos dos conjugados preparados en (1),

para dar una composición que incluye el transportador común en una forma no conjugada, siendo la concentración del transportador común no conjugado menor de 10 μ g/ml.

El procedimiento puede incluir una o más etapas de medición de la cantidad de transportador común no conjugado. Dichas mediciones pueden realizarse en los conjugados individuales antes de la mezcla y/o en los conjugados combinados después de la mezcla. Un conjugado individual puede rechazarse o seleccionarse para mezcla basándose en los resultados de dichas mediciones y de forma similar la composición final puede rechazarse o seleccionarse para puesta en venta para médicos basándose en los resultados de dichas mediciones.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición para inmunizar a un paciente contra una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis* que comprende las etapas de: a) seleccionar n serogrupos meningocócicos diferentes a partir del grupo constituido por A, C, W135 e Y, donde el valor de n es 2, 3 ó 4; (b) para cada uno de los n grupos seleccionados, preparar un conjugado de (i) el sacárido capsular de ese serogrupo y (ii) una proteína transportadora, donde cada uno de los n conjugados usa la misma proteína transportadora ("el transportador común"); y (c) mezclar los n conjugados preparados en la etapa (b) para dar una composición que incluye el transportador común en una forma no conjugada, siendo la concentración del transportador común no conjugado menor de 10 μ g/ml. Preferiblemente el valor de n es 4 de modo que la invención proporciona un procedimiento para preparar una composición para inmunizar a un paciente contra una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis* que comprende las etapas de: (a) preparar para cada uno de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo y (ii) una proteína transportadora, donde cada uno de los cuatro conjugados usa la misma proteína transportadora; y (b) mezclar los conjugados para dar una composición que incluye el transportador común en una forma no conjugada, siendo la concentración del transportador común no conjugado menor de 10 μ g/ml.

Como anteriormente, este procedimiento puede incluir una o más etapas de medir la cantidad de transportador común no conjugado, antes y/o después de mezclar en la etapa (b).

Los conjugados

La conjugación se usa para aumentar la inmunogenicidad de sacáridos, ya que los convierte de antígenos independientes de T a antígenos dependientes de T, permitiendo de este modo la sensibilización para memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas [por ejemplo, referencia 17] y es una técnica bien conocida [por ejemplo, revisada en las referencias 18 a 27].

La composición de la invención incluye al menos dos (es decir, 2, 3 ó 4) de los siguientes conjugados meningocócicos: (a) conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A y (ii) una proteína transportadora; (b) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C y (ii) una proteína transportadora; (c) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) una proteína transportadora; (d) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y y (ii) una proteína transportadora.

De estos conjugados, al menos dos (es decir, 2, 3 ó 4) usan una proteína transportadora común. Esto no significa que una sola molécula de conjugado incluya sacáridos de más de un serogrupo (consúltense las referencias 28 y 29). En su lugar, una sola molécula conjugada lleva un sacárido de un solo serogrupo, pero el mismo tipo de proteína transportadora se usa para cada serogrupo diferente. Dentro de una sola molécula conjugada, sin embargo, puede existir más de un tipo de sacárido (por ejemplo, fragmentos de longitud diferente), pero éstos procederán de un solo serogrupo. Como ejemplo de uso de un transportador común, una muestra de proteína puede dividirse en cuartos, usándose después cada cuarto para preparar un conjugado usando fragmentos de sacáridos capsulares de un solo serogrupo, y los conjugados pueden mezclarse después para dar un conjugado tetravalente con un transportador común.

Los sacáridos capsulares se seleccionan de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y, de modo que las composiciones incluyen sacáridos de 2, 3 o los 4 de estos cuatro serogrupos. Composiciones específicas comprenden sacáridos de: serogrupos A y C; serogrupos A y W135; serogrupos A e Y; serogrupos C y W135; serogrupos C e Y; serogrupos W135 e Y; serogrupos A y C y W135; serogrupos A y C e Y; serogrupos A y W135 e Y; serogrupos C y W135 e Y; serogrupos A y C y W135 e Y. Se prefieren composiciones que incluyen al menos el serogrupo C (por ejemplo, A y C) y son más preferidas composiciones que incluyen sacáridos de los cuatro serogrupos.

Los sacáridos capsulares de cada uno de estos cuatro serogrupos están bien caracterizados. El sacárido capsular del meningococo del serogrupo A es un homopolímero de *N*-acetil-*D*-manosamina-1-fosfato con enlace ($\alpha 1 \rightarrow 6$) con *O*-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. Los grupos acetilo pueden sustituirse con grupos de bloqueo para evitar la hidrólisis [30] y dichos sacáridos modificados siguen siendo sacáridos del serogrupo A dentro del significado de la presente invención. El sacárido capsular del serogrupo C es un homopolímero de ácido siálico con enlace ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (ácido *N*-acetil neuramínico o "NeuNAc").

La mayoría de cepas del serogrupo C tienen grupos *O*-acetilo en C-7 y/o C-8 de los restos de ácido siálico, pero aproximadamente el 15% de los aislados clínicos carecen de estos grupos *O*-acetilo [31, 32]. La estructura de sacárido se escribe como $\rightarrow 9$ -Neu *p* NAac 7/8 OAc- ($\alpha 2 \rightarrow$). El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades disacáridas de ácido siálico-galactosa. Como el sacárido del serogrupo C tiene una *O*-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [33]. La estructura se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Gal- α -($1 \rightarrow$). El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto porque la unidad de repetición disacárida incluye glucosa en lugar de galactosa. Como el serogrupo W135, tiene una *O*-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [33]. La estructura del serogrupo Y se escribe como: $\rightarrow 4$ -D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -($2 \rightarrow 6$)-D-Glc- α -($1 \rightarrow$).

Los sacáridos usados de acuerdo con la invención pueden estar *O*-acetilados como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, con el mismo patrón de *O*-acetilación que se observa en sacáridos capsulares nativos), o pueden estar parcialmente o totalmente des-*O*-acetilados en una o más posiciones de los anillos sacáridos o pueden estar hiper-*O*-acetilados respecto a los sacáridos capsulares nativos.

Los sacáridos usados de acuerdo con la invención son preferiblemente más cortos que los sacáridos capsulares nativos que se observan en bacterias. Por lo tanto, preferiblemente los sacáridos se despolimerizan, produciéndose la despolimerización después de la purificación pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de cadena de los sacáridos. Un procedimiento de despolimerización preferido implica el uso de peróxido de hidrógeno [7]. Se añade peróxido de hidrógeno a un sacárido (por ejemplo, para dar una concentración final de H₂O₂ del 1%) y después se incuba la mezcla (por ejemplo, a aproximadamente 55°C) hasta que se haya logrado una reducción de la longitud de cadena deseada. Otro procedimiento de despolimerización implica hidrólisis ácida [8], teniendo los sacáridos despolimerizados preferidos en conjugados de la invención el siguiente intervalo de grados de polimerización promedio: A = 10-20; C = 12-22; W135 = 15-25; Y = 15-25. Se conocen otros procedimientos de despolimerización por el especialista. Los sacáridos usados para preparar conjugados para el uso de acuerdo con la invención pueden obtenerse por cualquiera de estos procedimientos de despolimerización. Puede usarse despolimerización para proporcionar una longitud de cadena óptima para la inmunogenicidad y/o para reducir la longitud de cadena para facilidad de manejo físico de los sacáridos.

Son proteínas transportadoras típicas para el uso en conjugados toxinas bacterianas, tales como toxina diftérica [por ejemplo, véase el capítulo 13 de la referencia 34; referencias 35-38] (o su mutante CRM197 [39-42]) y toxina tetánica, habitualmente en forma de toxoide (por ejemplo, obtenida por tratamiento con un compuesto químico inactivante, tal como formalina o formaldehído). Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [43], péptidos sintéticos [44,45], proteínas de choque térmico [46, 47], proteínas de pertussis [48, 49], citocinas [50], linfocinas [50], hormonas [50], factores de crecimiento [50], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células T CD4⁺ humanas de diversos antígenos derivados de patógenos [51], proteína D de *H. influenzae* [52-54], neumolisina [55], proteína de superficie neumocócica PspA [56], proteínas de captación de hierro [57], toxina A o B de *C. difficile* [58], etc.

Son cuatro proteínas transportadoras particularmente preferidas para el uso como transportadores comunes toxoide diftérico (Dt), toxoide tetánico (Tt), CRM197 y proteína D de *H. influenzae*. Se prefieren estas proteínas porque son los transportadores principales actualmente en uso en vacunas pediátricas y por lo tanto son los transportadores con mayor riesgo de supresión por transportador, por ejemplo, a partir de la administración anterior, simultánea o posterior de otras vacunas. Los transportadores comunes más preferidos son Dt y la proteína D, ya que estas proteínas se usan en vacunas pediátricas existentes menos frecuentemente que CRM197 y Tt, por ejemplo, los conjugados Hib de GSK usan Tt como transportador, el producto HibTITER™ usa CRM197, los conjugados neumocócicos en Prevenar™ usan CRM197, los productos Menjugate™ y Meningitec™ usan CRM197 y NeisVac-C™ usa Tt. Para minimizar adicionalmente el riesgo de supresión por transportador, por lo tanto, se usan Dt y proteína D de *H. influenzae* como transportadores comunes.

Preferiblemente los conjugados se mezclan para dar sustancialmente una proporción de 1:1:1:1 (medida como masa de sacárido), por ejemplo, la masa de cada sacárido de serogrupo está en el $\pm 10\%$ de uno a otro. Una cantidad típica de antígeno meningocócico por serogrupo en una composición es de entre 1 μg y 20 μg , por ejemplo, de entre 2 y 10 μg por serogrupo, o de aproximadamente 4 μg . Como alternativa a una proporción 1:1:1:1, puede usarse una dosis de serogrupo A doble (2:1:1:1).

Se prefieren conjugados con una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre 1:15 (es decir, proteína en exceso) y 15:1 (es decir, sacárido en exceso), preferiblemente de entre 1:5 y 5:1. Se prefiere proteína transportadora en exceso. Se prefieren conjugados con proporción de sacárido:proteína de aproximadamente 1:12 o aproximadamente 1:3, particularmente donde el transportador es Dt.

Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con un enlazador adecuado cuando sea necesario.

Típicamente el sacárido se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación [59, 60, etc.]. Otras técnicas adecuadas usan ésteres activos, carbodiimidas, hidrazidas, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 24).

Pueden realizarse enlaces mediante un grupo enlazador usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 61 y 62. Un tipo de enlace implica la aminación reductora del polisacárido, acoplando el grupo amino resultante con un extremo de un grupo enlazador de ácido adípico y acoplando después una proteína al otro extremo del grupo enlazador de ácido adípico [22, 63, 64]. Otros enlazadores incluyen B-propionamido [65], nitrofenil-etilamina [66], haluros de haloacilo [67], enlaces glicosídicos [68], ácido 6-aminocaproico [69], ADH [70], restos C₄ a C₁₂ [71], etc. Como alternativa a usar un enlazador, puede usarse un enlace directo. Los enlaces directos con la proteína pueden comprender oxidación del polisacárido seguido de aminación reductora con la proteína, como se describe en, por ejemplo, las referencias 72 y 73.

Un procedimiento de conjugación preferido implica: introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, por sustitución de grupos =O terminales con -NH₂), seguido de derivatización con un diéster adípico (por ejemplo, diéster de N-hidroxisuccinimida del ácido adípico) y reacción con proteína transportadora (por ejemplo, CRM197). Pueden encontrarse detalles adicionales de este procedimiento de conjugación en la referencia 8. Los conjugados que pueden obtenerse mediante este procedimiento son conjugados preferidos para el uso de acuerdo con la invención.

En otro procedimiento de conjugación preferido, se hace reaccionar un sacárido con dihidrazida de ácido adípico. Para el serogrupo A, también puede añadirse carbodiimida (EDAC) en esta fase. Después de un periodo de reacción, se añade cianoborohidruro de sodio. Después puede prepararse un sacárido derivatizado, por ejemplo, por ultrafiltración. El sacárido derivatizado se mezcla después con proteína transportadora (por ejemplo, con un toxoide diftérico) y se añade carbodiimida. Después de un periodo de reacción, puede recuperarse el conjugado. Pueden encontrarse detalles adicionales de este procedimiento de conjugación en la referencia 8. Los conjugados que pueden obtenerse por este procedimiento son conjugados preferidos para el uso de acuerdo con la invención, por ejemplo, conjugados que comprenden un transportador de toxoide diftérico y un enlazador de ácido adípico.

En otro procedimiento de conjugación preferido, un sacárido se derivatiza con un reactivo de cianilación [60], seguido de acoplamiento con una proteína (directo o después de la introducción de un grupo nucleófilo tiol o hidrazida en el transportador) sin la necesidad de usar un enlazador. Los reactivos de cianilación adecuados incluyen tetrafluoroborato de 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinio ("CDAP"), p-nitrofenilcianato y tetrafluoroborato de N-cianotrietilamonio ("CTEA"). Se prefiere CDAP, particularmente cuando la proteína D de *H. influenzae* es el transportador común. Se prefiere acoplamiento directo.

Los conjugados se preparan preferiblemente por separado y después se mezclan. Después de la mezcla, puede ajustarse la concentración de los conjugados mezclados, por ejemplo, con solución salina tamponada con fosfato apirógena estéril.

Además del transportador común, pueden estar presentes conjugados con otras proteínas transportadoras en composiciones de la invención. En general, sin embargo, se prefiere que todos los conjugados meningocócicos en la composición usen el mismo transportador común.

En composiciones de la invención, la cantidad de transportador (conjugado y no conjugado) de cada conjugado preferiblemente no es superior a 100 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo $<30 \mu\text{g/ml}$ de proteína transportadora de cada conjugado. Las composiciones preferidas incluyen una concentración total de transportador común (solamente para los conjugados meningocócicos combinados o, preferiblemente, para la composición en su totalidad) de menos de 500 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, menos de 400 $\mu\text{g/ml}$, menos de 300 $\mu\text{g/ml}$, menos de 200 $\mu\text{g/ml}$, menos de 100 $\mu\text{g/ml}$, menos de 50 $\mu\text{g/ml}$, etc.

Proteína transportadora común no conjugada

Las composiciones de la invención incluyen el transportador común de una forma no conjugada, pero el transportador común no conjugado está presente a menos de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Mediante el control de factores tales como condiciones de conjugación, purificación post-conjugación, condiciones de almacenamiento post-conjugación (temperatura, pH, humedad, etc.) entonces es posible, de acuerdo con la invención, asegurar que la cantidad de transportador común no conjugado se mantiene con precisión por debajo de 10 $\mu\text{g/ml}$ y, típicamente, puede mantenerse incluso menor, por ejemplo, por debajo de 9 $\mu\text{g/ml}$, por debajo de 8 $\mu\text{g/ml}$, por debajo de 7 $\mu\text{g/ml}$, por debajo de 6 $\mu\text{g/ml}$, por debajo de 5 $\mu\text{g/ml}$, por debajo de 4 $\mu\text{g/ml}$, por debajo de 3 $\mu\text{g/ml}$, por debajo de 2 $\mu\text{g/ml}$, por debajo de 1 $\mu\text{g/ml}$, por debajo de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, etc.

Por razones prácticas, sin embargo, es ventajoso incluir un nivel reducido de transportador común no conjugado, para proporcionar un efecto adyuvante ligero sin que lleve a problemas de supresión por transportador. Por lo tanto, la concentración de transportador común no conjugado en la composición de la invención es preferiblemente $\geq a \mu\text{g/ml}$ pero $< b \mu\text{g/ml}$, donde $b > a$ y donde: (i) a se selecciona del grupo constituido por 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3 y 5; y (ii) b se selecciona del grupo constituido por 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

El transportador no conjugado en las composiciones de la invención tiene dos orígenes. En primer lugar, puede venir de los conjugados individuales que se mezclan. Los conjugados individuales pueden incluir transportador residual sin reaccionar de la reacción de conjugación y pueden incluir transportador que se ha liberado por degradación de material conjugado. En segundo lugar, puede venir de la degradación de conjugados después de mezcla, por ejemplo, después de almacenamiento de la composición. Normalmente no se añadirá transportador no conjugado a propósito como una etapa separada durante la fabricación. Por lo tanto, la concentración de transportador común no conjugado en una composición puede aumentar con el tiempo. Son composiciones preferidas aquellas con transportador común no conjugado $<10 \mu\text{g/ml}$ cuando se mide 6 horas después de que se hayan mezclado todos los conjugados meningocócicos. Otras composiciones preferidas son las que tienen $<10 \mu\text{g/ml}$ de transportador común no conjugado a lo largo de todo un periodo de al menos 1 mes (por ejemplo 2 meses, 3 meses, 6 meses o más) partiendo del tiempo de la primera mezcla de conjugado.

En los procedimientos de la invención, los conjugados que se mezclan pueden incluir un transportador común no conjugado y el transportador no conjugado presente después de la mezcla persistirá a partir de los conjugados componentes. Si la composición de la invención incluye un total de $x \mu\text{g}$ de transportador común no conjugado a partir de conjugados meningocócicos y n conjugados meningocócicos diferentes, entonces, de promedio, cada conjugado habrá aportado $x/n \mu\text{g}$ de transportador común no conjugado. En procedimientos preferidos de la invención, en los que la composición incluye un total de $x \mu\text{g}$ de transportador común no conjugado a partir de los conjugados meningocócicos, entonces la cantidad de cada uno de los n conjugados meningocócicos individuales se selecciona para proporcionar una cantidad de transportador común no conjugado dentro del $\pm 15\%$ de x/n , por ejemplo del $\pm 10\%$, $\pm 7,5\%$ o $\pm 5\%$. En términos de concentración, cada conjugado individual aporta preferiblemente menos de 2 $\mu\text{g/ml}$ de transportador no conjugado.

El transportador común no conjugado en una composición puede estar presente en solución, puede estar presente como precipitado, o puede estar adsorbido a cualquier adyuvante que pueda estar presente.

Pueden medirse niveles de transportador no conjugado usando procedimientos convencionales y conocidos, por ejemplo, los usados previamente para evaluar el transportador no conjugado en vacunas conjugadas contra Hib.

Para comparar los niveles de transportador no conjugado respecto a transportador total (o respecto a transportador conjugado), entonces generalmente es necesario separar el transportador no conjugado del transportador conjugado de modo que puedan ensayarse por separado. Puesto que el transportador conjugado es de mayor tamaño que el transportador no conjugado, entonces un modo de conseguir esto es separar por tamaño, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaños, mediante electroforesis, etc. Son PM aproximados de transportadores típicos (en forma monomérica): CRM197 = 58 kDa; Dt = 63 kDa; Tt = 150 kDa; proteína D = 42 kDa.

Un procedimiento de medición del nivel de transportador no conjugado comprende una etapa de separación electroforética, comparándose el nivel de transportador no conjugado con uno o más patrones que contienen una cantidad conocida del transportador. Después de la cuantificación de proteína (por ejemplo, mediante tinción, tal como mediante tinción de plata) entonces puede determinarse la cantidad relativa respecto al patrón o patrones. También puede procesarse un tercer análisis en paralelo, en el que se mezcla una muestra del transportador no conjugado con el patrón, comparándose esta mezcla también con las dos bandas anteriores.

Otros procedimientos para medir proteína transportadora no conjugada pueden implicar electroforesis capilar [74] (por ejemplo, en solución libre) o cromatografía electrocinética micelar [75], particularmente cuando el transportador común es un toxoide diftérico. La resolución del conjugado y del transportador pueden mejorarse aumentando la concentración de borato durante el análisis.

Pueden realizarse ensayos para medir los niveles de transportador no conjugado en diversas fases durante procedimientos de la invención. Por ejemplo, pueden realizarse en uno o más de los conjugados individuales antes de que se mezclen y/o pueden realizarse después de la mezcla. La invención requiere que una composición incluya menos de 10 $\mu\text{g/ml}$ de transportador meningocócico común no conjugado, como se ha descrito anteriormente, y este nivel puede verificarse realizando el ensayo después de la mezcla. Como alternativa al ensayo después de la mezcla, sin embargo, el ensayo puede realizarse en los conjugados individuales antes de la mezcla, usándose después los resultados individuales para calcular el nivel final (teniendo en cuenta cualquier dilución, *etc.*), con tal de que se usen condiciones en la mezcla que se sepa que no provocan un aumento de transportador no conjugado.

Con los ensayos de medición y una cantidad máxima permitida de proteína transportadora no conjugada (por ejemplo, 10 $\mu\text{g/ml}$, como se ha mencionado anteriormente), el especialista puede comprobar si cualquier composición particular se incluye en el alcance de la invención. Además, el especialista puede aceptar o rechazar (a) un conjugado individual antes de la mezcla y/o (b) conjugados combinados después de la mezcla, basándose en si el nivel de proteína transportadora no conjugada está por encima o por debajo de la cantidad máxima permitida. Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para preparar una composición, que comprende las etapas de mezcla definidas anteriormente y que comprende además la etapa de: medir la concentración de transportador común no conjugado en la composición; y (i) si la concentración de transportador no conjugado es $<10 \mu\text{g/ml}$, aceptar la composición para fabricación además de vacunas y/o para administración a seres humanos; o (ii) si la concentración de transportador no conjugado es $\geq 10 \mu\text{g/ml}$, rechazar la composición.

Además de incluir sólo pequeñas cantidades de transportador común, las composiciones preferidas de la invención incluyen de forma similar sólo cantidades pequeñas de sacáridos capsulares meningocócicos no conjugados. Por lo tanto, la composición incluye preferiblemente no más de 2 $\mu\text{g/ml}$ (medido como sacárido) de sacárido no conjugado, por ejemplo, $<1,5 \mu\text{g/ml}$, $<1 \mu\text{g/ml}$, $<0,5 \mu\text{g/ml}$, *etc.*

La composición

Además de comprender conjugados meningocócicos y proteína transportadora no conjugada, las composiciones de la invención incluirán típicamente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa, trehalosa, lactosa y agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas). Dichos vehículos son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, *etc.* Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH y similares. Un vehículo típico es solución salina fisiológica tamponada con fosfato apirógena estéril. Está disponible un análisis minucioso de vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables en la referencia 76.

Las composiciones usadas de acuerdo con la invención pueden incluir un antimicrobiano, particularmente si se envasan en un formato de dosis múltiple.

Las composiciones usadas de acuerdo con la invención pueden comprender un detergente por ejemplo un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Generalmente están presentes detergentes a niveles reducidos, por ejemplo del $<0,01\%$.

Las composiciones usadas de acuerdo con la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo cloruro sódico) para dar tonicidad. Es típica una concentración de $\text{NaCl } 10 \pm 2 \text{ mg/ml}$.

Las composiciones usadas de acuerdo con la invención incluirán generalmente un tampón, por ejemplo, un tampón fosfato.

Las infecciones bacterianas pueden afectar a diversas áreas del cuerpo y por lo tanto pueden prepararse composiciones en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una composición liofilizada). La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, como una pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración oral, por ejemplo, como un comprimido o cápsula o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o una pulverización. La composición puede prepararse como un supositorio u óvulo vaginal. La composición puede prepararse para administración nasal, ótica u ocular, por ejemplo, como pulverización, gotas, gel o polvo [por ejemplo, referencias 77 y 78]. En general, sin embargo, los conjugados meningocócicos se formulan para inyección intramuscular.

Las composiciones usadas de acuerdo con la invención pueden incluir o no un adyuvante de vacuna. Los adyuvantes que pueden usarse en composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación:

5 A. Composiciones que contienen minerales

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para el uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, *etc.* [por ejemplo, véanse
10 los capítulos 8 y 9 de la referencia 79] o mezclas de diferentes compuestos minerales, adoptando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, *etc.*). Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [80].

Se prefieren particularmente fosfatos de aluminio y un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo
15 con una relación molar de PO_4/Al de entre 0,84 y 0,92, incluido a aproximadamente 0,6 mg Al^{3+}/ml . Puede usarse adsorción con una baja dosis de fosfato de aluminio, por ejemplo de entre 50 y 100 μg de Al^{3+} por conjugado por dosis.

Los conjugados pueden o no adsorberse (o pueden adsorberse parcialmente) a cualquier sal de aluminio que esté
20 presente. Cuando una composición incluye conjugados de múltiples especies bacterianas entonces no todos los conjugados necesitan estar adsorbidos.

25 B. Emulsiones oleosas

Las composiciones de emulsión oleosa adecuadas para usar como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 [Capítulo 10 de la referencia 79; véase también la referencia 81] (Escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5%, formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador). También puede usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).
30

C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la referencia 79]

También pueden usarse formulaciones de saponina como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo
35 heterólogo de glicósidos de esterol y glicósidos de triterpenoide que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies vegetales. Las saponinas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado ampliamente como adyuvantes. También puede obtenerse comercialmente saponina a partir de *Smilax ornata* (zarzaparilla), *Gypsophilla paniculada* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (hierba jabonera). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como
40 formulaciones lipídicas, tales como ISCOM. QS21 se comercializa como StimulonTM.

Se han purificado composiciones de saponina usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Se describe un procedimiento de producción de QS21 en la referencia 82. Las formulaciones de
45 saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol [83].

Pueden usarse combinaciones de saponinas y colesterol para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la referencia 79]. Los ISCOM también incluyen típicamente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en ISCOM.
50 Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Se describen adicionalmente ISCOM en las referencias 83-85. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional [86].

Puede encontrarse una recapitulación del desarrollo de adyuvantes basados en saponinas en las referencias 87 y
55 88.

D. Virosomas y partículas similares a virus

También pueden usarse virosomas y partículas similares a virus (VLP) como adyuvantes en la invención. Estas
60 estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus combinadas o formuladas opcionalmente con un fosfolípido. Generalmente no son patógenos, no son replicantes y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse o aislarse de forma recombinante a partir de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para el uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas de virus influenza (tales como HA o NA), virus de la Hepatitis B (tales como proteínas del núcleo o de la cápsida), virus de la Hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, Rotavirus, virus de la glosopeda, Retrovirus, virus Norwalk, virus del Papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas de cubiertas), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como proteína de retrotransposón Ty p1). Se analizan VLP adicionalmente en las referencias 89-94. Se analizan virosomas
65 adicionalmente, por ejemplo, en la referencia 95.

E. Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes adecuados para el uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados de Lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas ADP-ribosilantes y derivados detoxificados de las mismas.

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Se describe una forma de “partícula pequeña” preferida de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado en la referencia 96. Dichas “partículas pequeñas” de 3dMPL son lo bastante pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 μm [96]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A tales como derivados de aminoalquil glucosaminida fosfato, por ejemplo, RC-529 [97, 98].

Los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. El OM-174 se describe por ejemplo en las referencias 99 y 100.

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

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 101, 102 y 103 describen posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, sustitución de guanósina con 2'-desoxi-7-desazaguanósina. El efecto adyuvante de oligonucleótidos CpG se analiza adicionalmente en las referencias 104-109.

La secuencia CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [110]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como un ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se analizan en las referencias 111-113. Preferiblemente, el CpG es un ODN CpG-A.

Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' está accesible para el reconocimiento de receptor. Opcionalmente, pueden unirse dos secuencias oligonucleotídicas CpG en sus extremos 3' para formar “inmunómeros”. Véanse, por ejemplo, las referencias 110 y 114-116.

Pueden usarse toxinas ADP-ribosilantes bacterianas y derivados detoxificados de las mismas como adyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína procede de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E. coli* “LT”), cólera (“CT”) o pertussis (“PT”). El uso de toxinas ADP-ribosilantes detoxificadas como adyuvantes en la administración en la mucosa se describe en la referencia 117 y como adyuvantes parenterales en la referencia 118. La toxina o toxoide está preferiblemente en forma de una holotoxina, que comprende subunidades tanto A como B. Preferiblemente, la subunidad A contiene una mutación detoxificante; preferiblemente la subunidad B no está mutada. Preferiblemente, el adyuvante es un mutante de LT detoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ADP-ribosilantes y derivados detoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72 como adyuvantes puede encontrarse en las referencias 119-126. Las referencias numéricas para sustituciones aminoacídicas se basan preferiblemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas ADP-ribosilantes expuestas en la referencia 127, incorporadas específicamente en este documento como referencia en su totalidad.

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para el uso como adyuvantes en la invención incluyen citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [128], etc.) [129], interferonas (por ejemplo interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [130] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosana y derivados de la misma como adyuvantes en la invención [131].

H. Micropartículas

También pueden usarse micropartículas como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (es decir, una partícula de ~ 100 nm a ~ 150 μm de diámetro, más preferiblemente de ~ 200 nm a ~ 30 μm de diámetro, y más preferiblemente de ~ 500 nm a ~ 10 μm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no

tóxicos (por ejemplo un poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, *etc.*), prefiriéndose la poli(láctida-co-glicolida), opcionalmente tratada para que tenga una superficie cargada negativamente (por ejemplo con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la referencia 79)

Se describen ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes en las referencias 132-134.

J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

Los adyuvantes adecuados para el uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [135]. Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol [136], así como tensioactivos de éteres o éster de alquilo de polioxietileno en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como octoxinol [137]. Se seleccionan éteres de polioxietileno preferidos a partir del grupo siguiente: polioxietilen-9-lauril éter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoril éter, polioxietilen-8-esteoril éter, polioxietilen-4-lauril éter, polioxietilen-35-lauril éter y polioxietilen-23-lauril éter.

K. Polifosfaceno (PCPP)

Se describen formulaciones de PCPP, por ejemplo, en las referencias 138 y 139.

L. Péptidos de muramilo

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

M. Compuestos de imidazoquinolona

Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para usar adyuvantes en la invención incluyen Imiquamod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las referencias 140 y 141.

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

Se describen otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes en el capítulo 7 de la referencia 79.

Se prefiere particularmente el uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio [por ejemplo, ejemplos 7 y 8 de la referencia 7; ejemplo J de la referencia 8], con o sin adsorción. También puede usarse una composición sin adyuvante de sal de aluminio [referencia 15]. El fosfato de calcio es otro adyuvante preferido. Los conjugados pueden mezclarse con (y opcionalmente adsorberse a) los adyuvantes por separado, y después los conjugados pueden mezclados entre sí o los conjugados pueden mezclarse entre sí y después mezclarse con adyuvante.

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

Las composiciones pueden incluir un conservante (por ejemplo tiomersal, 2-fenoxietanol) o pueden carecer de conservante. Las composiciones preferidas de la invención no incluyen ningún material de mercurio, por ejemplo, carecen de tiomersal.

Pueden presentarse composiciones en viales o pueden presentarse en jeringas cargadas listas para usar. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una sola dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una sola dosis o múltiples dosis. Las composiciones inyectables serán habitualmente soluciones o suspensiones líquidas. Como alternativa, pueden presentarse en forma sólida (por ejemplo, secada por congelación) para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

Las composiciones pueden envasarse en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiple. Para formas de dosis múltiple, se prefieren viales a jeringas precargadas. Pueden establecerse de forma rutinaria volúmenes de dosificación eficaces, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

Las composiciones comprenderán una cantidad inmunológicamente eficaz de los conjugados meningocócicos, así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, en una sola dosis o como parte de una serie, genera una respuesta inmune protectora anti-meningocócica en pacientes. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y el estado físico del individuo a tratar, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, *etc.*), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración de la situación médica del médico que lo trate y otros factores pertinentes. Se espera que la cantidad estará en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos de rutina, y una cantidad típica de cada antígeno meningocócico por dosis está entre 1 μg y 20 μg por serogrupo (medida en términos de sacáridos) por ejemplo, entre 2 y 10 μg por serogrupo o entre 3 y 8 μg por serogrupo. Se prefiere una dosis de aproximadamente 4 μg por serogrupo (es decir, un total de 16 μg en una mezcla tetravalente) o de aproximadamente 5 μg por serogrupo (es decir, un total de 20 μg en una mezcla tetravalente).

Liofilización

Las vacunas se administran típicamente por inyección, particularmente inyección intramuscular. Las composiciones de la invención se presentan generalmente en el momento del uso como soluciones o suspensiones acuosas. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones están en forma acuosa desde la fase de envasado hasta la fase de administración (vacuna "totalmente líquida"). En otras realizaciones, sin embargo, pueden envasarse uno o más componentes de las composiciones en una forma liofilizada y puede reconstituirse una vacuna para la administración real cuando sea necesario. Por lo tanto, pueden prepararse composiciones de la invención en una fase de envasado o pueden prepararse de forma extemporánea antes del uso. Se conoce en la técnica la liofilización de conjugados meningocócicos, por ejemplo, el producto MenjugateTM se presenta en forma liofilizada mientras que NeisVac-CTM y MeningitecTM son vacunas totalmente líquidas.

En algunas realizaciones, por lo tanto, las composiciones de la invención están en forma liofilizada. Pueden liofilizarse conjugados meningocócicos individuales antes de la mezcla o pueden mezclarse en forma acuosa y después liofilizarse.

La invención también proporciona un kit para preparar una composición de la invención, donde el kit comprende al menos un conjugado meningocócico en forma liofilizada y al menos un conjugado meningocócico en forma acuosa. El kit puede comprender dos viales (uno que contiene material acuoso y uno que contiene material liofilizado), o puede comprender una jeringa cargada lista para usar o un vial, por ejemplo, usándose el contenido de la jeringa para reconstituir el contenido del vial antes de la inyección. Para composiciones que incluyen un conjugado del serogrupo A, entonces el sacárido del serogrupo A puede liofilizarse, mientras que el conjugado o conjugados de otro serogrupo o serogrupos pueden presentarse en forma líquida.

La invención también proporciona un kit para preparar una composición acuosa de la invención, donde el kit comprende (i) una composición liofilizada de la invención y (ii) material acuoso, donde el componente (ii) es para reconstituir el componente (i) para proporcionar la composición acuosa. Preferiblemente el componente (ii) es estéril, apirógeno, *etc.*, como se ha descrito anteriormente.

Por lo tanto, la invención incluye composiciones en forma totalmente liofilizada, forma totalmente acuosa y en forma lista para reconstitución para dar una formulación acuosa.

Para estabilizar conjugados durante la liofilización, se prefiere incluir un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo sacarosa o trehalosa), por ejemplo, a entre 1 mg/ml y 30 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 25 mg/ml) en la composición. Se prefiere liofilización en presencia de sacarosa. Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden incluir un alcohol de azúcar o un disacárido, particularmente cuando están en forma liofilizada o se han reconstituido a partir de material liofilizado.

Cuando una composición está en forma liofilizada (o incluye un componente liofilizado) entonces el material liofilizado preferiblemente no incluye un adyuvante de aluminio. Si se desea una composición acuosa final con un adyuvante de aluminio entonces el adyuvante debería estar presente en su lugar en el material usado para reconstituir el material liofilizado (consúltese MenjugateTM).

El paciente

Las composiciones de la invención son para proteger a pacientes contra enfermedades meningocócicas, por ejemplo, contra meningitis, más preferiblemente meningitis bacteriana, y más preferiblemente, meningitis meningocócica.

El paciente a inmunizar será típicamente un ser humano. El ser humano será generalmente de al menos 1 mes de edad, por ejemplo, al menos 2 meses de edad, al menos 4 meses de edad, al menos 6 meses de edad, al menos 2 años de edad, al menos 5 años de edad, al menos 11 años de edad, al menos 17 años de edad, al menos 40 años de edad, al menos 55 años de edad, etc. Un conjunto preferido de pacientes está en el grupo de edades de 2-55 años de edad y otro conjunto preferido de pacientes está en el grupo de edades de 11-55 años de edad. Un conjunto preferido adicional de pacientes es menor de 11 años de edad, por ejemplo, de 2-11 años de edad. Un conjunto preferido adicional de pacientes es menor de 2 años de edad, por ejemplo, menor de 1 año de edad. Las composiciones de la invención son particularmente útiles para inmunizar pacientes que ya han recibido la proteína transportadora común en una inmunización previa.

Antes o sustancialmente al mismo tiempo que se recibe la composición de la invención, el paciente puede inmunizarse con una o más vacunas adicionales. Otras vacunas que pueden haberse administrado o que pueden administrarse incluyen, pero sin limitación: antígenos de difteria, tales como un toxoide diftérico; antígenos de tétanos, tales como un toxoide tetánico; antígeno o antígenos de pertussis, tal como una vacuna de pertussis de célula completa/celular ("Pw") o preferiblemente una vacuna de pertussis acelular ("Pa"); sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo B, típicamente conjugado; antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg); poliovirus, tal como una vacuna de poliovirus inactivada (IPV) o una vacuna de poliovirus oral (OPV); sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, típicamente multivalente y conjugado; virus influenza; BCG; antígenos del virus de la hepatitis A; virus del sarampión; virus de las paperas; virus de la rubéola; virus de la varicela; etc. Se proporcionan a continuación detalles adicionales o algunas de estas vacunas adicionales.

El resultado de administrar una composición de la invención es preferiblemente que, para cada serogrupo administrado, el paciente genera una respuesta de anticuerpos séricos bactericidas (SBA), siendo el aumento del título de SBA (en comparación con el paciente preinmunizado antes de recibir la composición) de al menos 4 veces y, preferiblemente, de al menos 8 veces. El ensayo de SBA es una correlación convencional para protección meningocócica. Se proporcionan detalles adicionales de correlaciones serológicas para vacunas meningocócicas en la referencia 147.

Componentes antigénicos adicionales de composiciones usadas de acuerdo con la invención

Pueden usarse composiciones de la invención para inmunizar a pacientes contra enfermedades meningocócicas y pueden usarse separadamente de otros componentes de vacunación. Además, no obstante, pueden usarse composiciones de la invención junto con otros componentes de vacunas. Estos otros componentes pueden administrarse separadamente de las composiciones de la invención, pero sustancialmente al mismo tiempo, o las composiciones de la invención pueden incluir estos componentes adicionales como parte de una vacuna de combinación.

Además de antígenos de conjugados meningocócicos, por lo tanto, las composiciones de la invención pueden incluir opcionalmente uno o más de los siguientes antígenos adicionales:

1. Un sacárido capsular conjugado de *H. influenzae* tipo B ("Hib") [por ejemplo, capítulo 14 de la referencia 34].

La proteína transportadora para el conjugado puede ser CRM197, un toxoide diftérico, un toxoide tetánico o un complejo de membrana externa de *N. meningitidis*. El resto sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo, fosfato de polirribosilribitol de longitud completa (PRP)), pero se prefiere despolimerizar los polisacáridos capsulares para formar oligosacáridos (por ejemplo, PM de ~1 a -5 kDa). Un conjugado de Hib preferido comprende un oligosacárido unido covalentemente a CRM197 a través de un enlazador de ácido adípico [148, 149]. La administración del antígeno de Hib a un paciente da como resultado preferiblemente una concentración de anticuerpo anti-PRP >0,15 µg/ml y, más preferiblemente, >1 µg/ml. Cuando una composición incluye un antígeno de sacárido de Hib, preferiblemente tampoco incluye un adyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio, entonces el antígeno Hib puede adsorberse al adyuvante [150] o puede no adsorberse [15]. La prevención de la adsorción puede conseguirse seleccionando el pH correcto durante la mezcla de antígeno/adyuvante, un adyuvante con un punto de carga cero apropiado y un orden de mezcla apropiado para los diversos antígenos diferentes en una composición [151].

2. Un sacárido capsular conjugado de *S. pneumoniae* [por ejemplo, capítulo 23 de la referencia 34; referencias 152-154].

Se prefiere incluir sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, se usan ampliamente mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes, como son vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [155]. Por ejemplo, Prevnar™ [156] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) con cada sacárido individualmente conjugado con CRM197 por aminación reductora, con 2 µg de cada sacárido por dosis de 0,5 ml (4 µg de serotipo 6B) y con conjugados adsorbidos sobre un adyuvante de fosfato de aluminio. Cuando se incluyen conjugados neumocócicos en composiciones para usar con la invención, la composición incluye preferiblemente al menos los serotipos 6B, 14B, 19F y 23F.

3. Un antígeno proteico de *Neisseria meningitidis* serogrupo B [por ejemplo, referencia 157].
4. Un antígeno de difteria, tal como un toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 13 de la referencia 34].
5. Un antígeno de tétanos, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 27 de la referencia 34].
6. Un antígeno de pertussis celular o de célula completa ("Pw") [por ejemplo, capítulo 21 de la referencia 34].
7. Uno o más antígenos de pertussis acelulares ("Pa") [por ejemplo, capítulo 21 de la referencia 34].

Un componente Pa incluirá generalmente uno, dos o tres de los siguientes antígenos bien caracterizados de *B. pertussis*: (1) toxoide de pertussis ("PT"), detoxificado por medios químicos o por mutagénesis dirigida, por ejemplo, el mutante "9K/129G" [158]; (2) hemaglutinina filamentosa ("FHA"); (3) pertactina (también conocida como "proteína de membrana externa de 69 kiloDalton"). Un componente Pa también puede incluir aglutinógeno 2 y/o aglutinógeno 3.

8. Un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie ("HBsAg") y/o núcleo [por ejemplo, referencias 159 y 164; capítulo 16 de la referencia 34], adsorbiéndose preferiblemente el antígeno de superficie sobre un fosfato de aluminio [160].

9. Uno o más antígenos de poliovirus (por ejemplo, 161, 162; capítulo 24 de la referencia 34] tal como IPV. Es normal la inclusión de cepa Mahoney, cepa MEF-1 y cepa Saukett.

10. Un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivado [por ejemplo, 163, 164; capítulo 15 de la referencia 34].

La composición puede incluir uno o más (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10) de estos antígenos adicionales. En otras realizaciones, la composición puede no incluir específicamente uno o más de estos antígenos adicionales.

Cuando están presentes, estos antígenos adicionales pueden o no adsorberse a una sal de aluminio.

Cuando se incluye un antígeno de difteria en la mezcla también se prefiere incluir antígeno de tétanos y antígenos de pertussis. De forma similar, cuando se incluye un antígeno de tétanos también se prefiere incluir antígenos de difteria y de pertussis. De forma similar, cuando se incluye un antígeno de pertussis también se prefiere incluir antígenos de difteria y de tétanos.

Típicamente, los antígenos en la mezcla estarán presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para generar una respuesta inmune contra ese antígeno. Se prefiere que la eficacia protectora de antígenos de sacáridos individuales no se elimine al combinarlos, aunque puede reducirse la inmunogenicidad real (por ejemplo, títulos de ELISA).

Si se están administrando conjugados meningocócicos en una serie de dosis entonces ninguna, algunas o todas las dosis pueden incluir estos antígenos extra.

Como alternativa a las composiciones que incluyen uno o más de estos 10 componentes adicionales, la invención proporciona un kit que comprende: (i) una composición de la invención, en forma acuosa o liofilizada; y (ii) una composición que comprende uno o más de estos 10 componentes adicionales. Cuando el componente (i) está liofilizado, entonces el componente (ii) está preferiblemente en forma acuosa y puede usarse para reconstituir (i).

Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden comercializarse para usarse por sí mismas, pueden comercializarse para uso junto con otros materiales de vacunas o pueden comercializarse como parte de un kit de vacunación.

Tratamientos médicos

La composición de la invención puede ser para uso en un procedimiento para tratar a un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición de la invención. El paciente puede presentar riesgo de padecer la enfermedad por sí mismo o puede ser una mujer gestante ("inmunización maternal").

La invención también proporciona una composición de la invención, para uso como un medicamento (por ejemplo, como una composición inmunógena o como una vacuna).

La invención también proporciona el uso de al menos dos de: (a) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A y (ii) una proteína transportadora; (b) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C y (ii) una proteína transportadora; (c) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) una proteína transportadora; (d) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y y (ii) una proteína transportadora, en la fabricación de un medicamento para inmunizar a un paciente contra una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis*, caracterizado porque (1) al menos dos de dichos conjugados (a), (b), (c) y (d) usan la misma proteína transportadora ("el transportador común") y (2) el medicamento incluye el transportador común de una forma no conjugada a una concentración de menos de 10 µg/ml.

Cuando una vacuna es para uso profiláctico, el paciente es preferiblemente un niño (por ejemplo, un niño en edad de aprender a caminar o un lactante); cuando la vacuna es para uso terapéutico, el paciente es preferiblemente un adulto. También puede administrarse a adultos una vacuna destinada a niños, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica controlar una infección meningocócica después de la administración de la composición de la invención. Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica controlar respuestas inmunes contra un polipéptido administrado después de la administración. Puede determinarse la inmunogenicidad de composiciones de la invención por administración de las mismas a sujetos de ensayo y se proporcionan correlaciones serológicas para vacunas meningocócicas en la referencia 147.

Generalmente se administrarán composiciones directamente a un paciente. Puede conseguirse administración directa por inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido) o por administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, ótica, pulmonar u otra administración mucosa. Se prefiere la administración intramuscular (por ejemplo, en el muslo o el brazo superior). La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero como alternativa puede usarse una inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

Se administran conjugados meningocócicos de múltiples serogrupos mezclados con una sola composición. La composición puede administrarse como una sola dosis o puede administrarse más de una vez en un programa de dosis múltiples. Pueden usarse dosis múltiples en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. Un programa de dosis primarias puede seguirse de un programa de dosis de refuerzo de los conjugados meningocócicos. Puede determinarse de forma rutinaria el tiempo adecuado entre dosis de sensibilización (por ejemplo, entre 4-16 semanas) y entre sensibilización y refuerzo.

La invención puede usarse para generar inmunidad sistémica y/o mucosa.

Composiciones específicas de la invención

Las realizaciones preferidas de la invención incluyen:

1. Una composición acuosa que comprende conjugados meningocócicos de los serogrupos C, W135 e Y, con un transportador CRM197 para cada uno. Los sacáridos se unen al transportador usando un enlazador de ácido adípico. La concentración de CRM197 no conjugado es $<5 \mu\text{g/ml}$. La concentración de cada conjugado (medido como sacárido) es de aproximadamente $10 \mu\text{g/ml}$. La composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio sin etapa de adsorción al adyuvante durante la preparación. La composición incluye cloruro de sodio, fosfato de sodio (monobásico y dibásico para tamponamiento) y pequeñas cantidades de polisorbato 80. La composición es para inyección intramuscular o puede usarse para reconstituir un conjugado de serogrupo A liofilizado.

2. La composición acuosa que surge de la reconstitución de un conjugado de serogrupo A liofilizado con la composición de la realización 1 anterior. El conjugado del serogrupo A también tiene un transportador CRM197. Después de la reconstitución, el conjugado del serogrupo A puede estar presente a aproximadamente $10 \mu\text{g/ml}$ o aproximadamente $20 \mu\text{g/ml}$ (dependiendo del factor de dilución). Después de la reconstitución, la concentración de CRM197 no conjugado continúa siendo $<5 \mu\text{g/ml}$.

3. Una composición acuosa que comprende conjugados meningocócicos de los serogrupos A y C con un transportador de proteína D de *H. influenzae* para ambos y con los sacáridos unidos al transportador usando química de CDAP. La concentración de la proteína D no conjugada es $<10 \mu\text{g/ml}$. La composición también incluye un conjugado de *H. influenzae* tipo b, estando el sacárido de Hib conjugado con una proteína transportadora de toxoide tetánico. La concentración de cada uno de los tres conjugados (medidos como sacárido) es de aproximadamente $10 \mu\text{g/ml}$. La composición no incluye adyuvante de sal de aluminio. La composición incluye sacarosa. El pH de la composición está entre 6 y 6,5, por ejemplo aproximadamente 6,1. La composición es para liofilización.

4. Una composición liofilizada que comprende conjugados meningocócicos de los serogrupos A y C con un transportador de proteína D de *H. influenzae* para ambos y con los sacáridos unidos al transportador usando química de CDAP. La concentración de proteína D no conjugada es $<10 \mu\text{g/ml}$. La composición también incluye un conjugado de *H. influenzae* tipo b, estando el sacárido de Hib conjugado con una proteína transportadora de toxoide tetánico. La composición no incluye adyuvante de sal de aluminio. La composición incluye sacarosa. La composición reconstituida con otros componentes vacunales, particularmente componentes vacunales no meningocócicos.

5. La composición acuosa que surge de la reconstitución de la composición de la realización 4 anterior con una composición de vacuna que comprende antígenos de difteria, tétanos y pertussis y que comprende opcionalmente además HBsAg. La vacuna de reconstitución incluirá adyuvantes de hidróxido de aluminio y/o fosfato.

6. Una composición acuosa que comprende conjugados meningocócicos de los serogrupos A, C, W135 e Y con un transportador de toxoide diftérico para cada uno. Los sacáridos pueden unirse al transportador usando un enlazador de ácido adípico. La concentración de Dt no conjugado es $<5 \mu\text{g/ml}$. La concentración de cada conjugado (medido como sacárido) es de aproximadamente $8 \mu\text{g/ml}$. La composición no incluye sales de aluminio. La composición es para inyección intramuscular.

General

El término “que comprende” incluye “que incluye”, así como “constituido por”, por ejemplo, una composición “que comprende” X puede estar constituida exclusivamente por X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

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

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

Las concentraciones de transportador común se han proporcionado anteriormente en las unidades de “ $\mu\text{g/ml}$ ” (microgramos por mililitro) pero, en un conjunto alternativo y paralelo de definiciones, estas concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ pueden sustituirse por concentraciones medidas en las unidades “Lf/ml” (unidades de floculación o el “límite de floculación” [165]) que es una unidad funcional para cuantificar toxoides tetánico y diftérico. Los valores numéricos se dividirán entre 4 (es decir, 3 $\mu\text{g/ml}$ sería 1 Lf/ml) y, cuando sea necesario, se redondearán al número entero más próximo (es decir, 10 $\mu\text{g/ml}$ serían 4 Lf/ml) en este conjunto alternativo de definiciones. Esta alternativa se proporciona en este documento simplemente por razones de comodidad y no debería tener influencia alguna sobre la invención cuando las concentraciones del transportador se proporcionan en $\mu\text{g/ml}$.

Modos de realizar la invención

Reducción de respuesta anti-serogrupo C en presencia de proteína transportadora no conjugada

NeisVac-C™ incluye sacárido capsular del serogrupo C (OAc⁻) conjugado con un transportador de toxoide tetánico, con un adyuvante de hidróxido de aluminio y con una proporción en peso de proteína:sacárido de ~2:1. Esta vacuna se administró a niños de edades de 3-6 ó 13-18, en solitario o con administración simultánea de toxoides tetánico y diftérico no conjugados, como se describe en la referencia 13. Se midieron las GMC de IgG específicas mediante ELISA de OAc⁺, mediante ELISA de OAc⁻ y mediante ELISA de alta avidez, y también se midieron los GMT de rSBA (contra cepa C11) [13]. Los resultados en los dos grupos de pacientes eran los siguientes, en relación con los resultados en pacientes que no recibieron la vacuna de Tt/Dt a la vez:

Extra Tt	GMC de ELISA OAc ⁺	GMC de ELISA OAc ⁻	GMC de ELISA OAc ⁺ alta avidez	GMT de RSBA
-	100%	100%	100%	100%
+	82%	62%	51%	50%

El efecto de Tt no conjugado sobre la respuesta inmune es evidente a partir de estos resultados. Para evitar este efecto en vacunas que comprenden más de un conjugado meningocócico, entonces, de acuerdo con la invención, el nivel de transportador no conjugado se mantiene por debajo de un nivel umbral.

Conjugados meningocócicos combinados

Pueden prepararse mezclas de conjugados meningocócicos para los serogrupos A + C, C + W + Y o A + C + W + Y como se describe en las referencias 7, 8 y 15. Estas vacunas tienen CRM197, proteína de D de *H. influenzae* o toxoide diftérico (Dt) como la proteína transportadora, unida covalentemente a los sacáridos. Se realizó lo siguiente con conjugados fabricados usando esencialmente el procedimiento de la referencia 8.

Para el serogrupo A, el polisacárido seco purificado se hidrolizó para proporcionar un grado promedio de polimerización (avDP) de 10-11. Para eliminar polisacáridos largos, se usó ultrafiltración de 30 kDa. Después se usó cromatografía de sefaroza Q para eliminar fragmentos de sacáridos cortos. Los sacáridos se sometieron a aminación reductora, seguido de ultrafiltración de 3 kDa para eliminar impurezas de bajo peso molecular. Los sacáridos aminados se concentraron y después se activaron usando el éster de bis-*N*-hidroxisuccinimida de ácido adípico. Este material es adecuado para preparación de conjugado. El éster activado se mezcla con transportador CRM197 purificado a un exceso molar de sacárido de 13:1, con transportador a 45 mg/ml en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,2). La conjugación se realiza a temperatura ambiente con agitación magnética durante entre 8 y 24 horas. La reacción se detiene por adición de NH₄Cl (concentración final 0,1 M) y después la solución se diluye con fosfato sódico 10 mM pH 7,2. Estas condiciones aseguran una conjugación eficaz y minimizan el nivel de proteína transportadora sin reaccionar que queda. De acuerdo con la invención, cualquier material sin reaccionar restante se elimina diligentemente, realizándose etapas adicionales en las 2 horas siguientes a la dilución mencionada anteriormente. Se realiza la ultrafiltración con un casete de 30 kDa con fosfato sódico 10 mM (pH 7,2) durante hasta 4 horas.

ES 2 329 059 T3

Para el serogrupo C, se usa esencialmente el mismo procedimiento, excepto: la hidrólisis inicial daba un avDP de entre 7 y 18; la reacción de conjugación tuvo lugar durante 14-22 horas a temperatura ambiente; se insertó una etapa adicional entre las etapas de conjugación y ultrafiltración, purificándose el conjugado usando cromatografía de interacción hidrofoba (columna de flujo rápido de Phenyl Sepharose; sulfato de amonio 1M, tampón fosfato 10 mM pH 7,2; elución por adición de tampón sin sulfato de amonio); y la ultrafiltración usaba un límite de 10 kDa.

Para los serogrupos W135 e Y, se usó esencialmente el mismo procedimiento que para el serogrupo A, excepto: la hidrólisis inicial daba un avDP de 20; exceso molar de sacárido de 12:1.

Mediante estos procedimientos, pueden conseguirse rutinariamente niveles de transportador no conjugado de menos de 1 μg (medido respecto a un contenido total de CRM197 de 50 μg) para cada conjugado.

Los cuatro volúmenes de conjugados pueden combinarse para dar composiciones de la invención.

En el ensayo clínico V59P2, realizado en Finlandia y Alemania con 620 sujetos de edades entre los 12-16 meses, se ensayaron cinco formulaciones de estos conjugados mixtos. Las dosis para cada sacárido de serogrupo, expresadas como μg de masa de sacárido por dosis de 0,5 ml, eran las siguientes después de la mezcla y dilución:

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

Las vacunas incluían un adyuvante de fosfato de aluminio [8]. Estaba presente CRM197 no conjugado a menos de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en las vacunas.

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

Se recogieron sueros de pacientes 1 mes después de la administración de vacuna y se ensayaron en un ensayo de SBA contra *N. meningitidis* de cada serogrupo, usando complemento humano. Se evaluó el aumento del título de SBA respecto a sueros a tiempo cero, siendo los criterios $\geq 1:4$ y $\geq 1:8$. También se midieron los títulos anti-cápsula (GMT) para cada serogrupo. Se muestran los resultados en la Tabla I a continuación.

Por lo tanto, las vacunas trivalentes y tetravalentes eran ambas inmunogénicas en niños en edad de aprender a caminar. Los conjugados eran inmunogénicos a dosis de sacáridos tan reducidas como de 2,5 μg por conjugado. La respuesta inmune era reforzable, con grandes aumentos del título de SBA después de la segunda dosis. No se observaron pruebas de supresión por transportador en este ensayo.

Se entenderá que la invención se ha descrito anteriormente a modo de ejemplo solamente y que pueden realizarse modificaciones continuando dentro del alcance de la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas.

TABLA 1

Resultados de ensayo V59P2

Grupo	A	C	W135	Y
	GMT (1 mes después 1 dosis)			
1	3,9	6,4	7,1	8,9

ES 2 329 059 T3

Grupo	A	C	W135	Y
2	2	6,1	8,3	8,5
3	5,7	5,2	6,9	12
4	3,8	4,5	7,0	9,6
5	3,9	5,3	7,0	12
GMT (1 mes después 2 dosis)				
1	27	89	22	37
2	2	80	20	57
3	29	76	28	58
4	14	47	20	35
5	17	71	23	52
% pacientes con SBA \geq1:4 (1 mes después 1 dosis)				
1	33	56	57	58
2	0	57	60	61
3	55	49	53	70
4	37	42	54	64
5	40	51	57	67
% pacientes con SBA \geq1:4 (1 mes después 2 dosis)				
1	100	100	96	96
2	0	100	73	92
3	91	96	95	95
4	84	96	88	96
5	80	100	80	92
% pacientes con SBA \geq1:8 (1 mes después 1 dosis)				
1	25	44	46	48
2	0	40	50	49

Grupo	A	C	W135	Y
3	39	34	45	64
4	23	30	44	51
5	26	35	40	60
% pacientes con SBA $\geq 1:8$ (1 mes después 2 dosis)				
1	92	100	85	93
2	0	100	64	92
3	87	96	95	82
4	60	92	77	92
5	72	92	72	88

Bibliografía

- [1] Baklaic y col. (1983) *Infect. Immun.* 42: 599-604.
- [2] Armand y col. (1982) *J. Biol. Stand.* 10: 335-339.
- [3] Cadoz y col. (1985) *Vaccine* 3: 340-342.
- [4] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2: 47-49.
- [5] Costantino y col. (1992) *Vaccine* 10: 691-8.
- [6] Lieberman y col. (1996) *JAMA* 275: 1499-503.
- [7] WO02/058737.
- [8] WO03/007985.
- [9] Rennels y col. (2002) *Pediatr Infect Dis J* 21: 978-979.
- [10] Campbell y col. (2002) *J Infect Dis* 186: 1848-1851.
- [11] Herzenberg y col. (1980) *Nature* 285: 664-667.
- [12] Dagan y col. (1998) *Infect Immun* 66: 2093-2098.
- [13] Burrage y col. (2002) *Infect Immun* 70: 4946-4954.
- [14] Reddin y col. (2001) *FEMS Immunol Med Microbiol* 31: 153-162.
- [15] WO02/00249.
- [16] EP-B-0831901.
- [17] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251): 195-196.
- [18] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2: S28-36.
- [19] Buttery y Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34: 163-168.

ES 2 329 059 T3

- [20] **Ahmad y Chapnick** (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13: 113-33, vii.
- [21] **Goldblatt** (1998) *J. Med Microbiol.* 47: 563-567.
- 5 [22] Patente Europea 0477508.
- [23] Patente de Estados Unidos 5.306.492.
- [24] WO98/42721.
- 10 [25] **Dick** y col. in Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) *Karger, Basel*, 1989, 10: 48-114.
- [26] Capítulo 10 de *Vaccine Protocols* (2ª edición, 2003). ISBN: 1-59259-399-2.
- 15 [27] Hermanson Bioconjugate Techniques, *Academic Press*, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [28] WO99/42130
- [29] Patente de Estados Unidos 4.711.779.
- 20 [30] WO03/080678.
- [31] **Globe** y col. (1979) *J Infect Dis* 139: 52-56
- 25 [32] WO94/05325; Patente de Estados Unidos 5.425.946.
- [33] Solicitud de Patente de Reino Unido 0323103.2.
- [34] *Vaccines*. (eds. Plotkin y Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- 30 [35] Patente de Estados Unidos 4.709.017.
- [36] WO93125210.
- 35 [37] Patente de Estados Unidos 5.917.017.
- [38] WO00/48638.
- [39] Del **Guidice** y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- 40 [40] **Anonymous** (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [41] **Anderson** (1983) *Infect Immun* 39(1): 233-238.
- 45 [42] **Anderson** y col. (1985) *J Clin Invest* 76(1): 52-59.
- [43] EP-A-0372501.
- [44] EP-A-0378881.
- 50 [45] EP-A-0427347.
- [46] WO93/17712
- 55 [47] WO94/03208.
- [48] WO98/58668.
- [49] EP-A-0471177.
- 60 [50] WO91/01146
- [51] **Falugi** y col. (2001) *Eur J Immunol* 31: 3816-3824.
- 65 [52] EP-A-0594610.
- [53] **Ruan** y col. (1990) *J Immunol* 145 :3379-3384.

ES 2 329 059 T3

[54] WO00/56360.

[55] **Kuo** y col. (1995) *Infect Immun* 63: 2706-13.

[56] WO02/091998.

[57] WO01/72337

[58] WO00/61761.

[59] **Lees** y col. (1996) *Vaccine* 14: 190-198.

[60] WO95/08348.

[61] Patente de Estados Unidos 4.882.317

[62] Patente de Estados Unidos 4.695.624

[63] **Porro** y col. (1985) *Mol Immunol* 22: 907-919.

[64] EP-A-0208375

[65] WO00/10599

[66] **Gever** y col. *Med. Microbiol. Immunol*, 165: 171-288 (1979).

[67] Patente de Estados Unidos 4.057.685.

[68] Patentes de Estados Unidos 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.

[69] Patente de Estados Unidos 4.459.286.

[70] Patente de Estados Unidos 4.965.338

[71] Patente de Estados Unidos 4.663.160.

[72] Patente de Estados Unidos 4.761.283

[73] Patente de Estados Unidos 4.356.170

[74] **Lamb** y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103: 251-258.

[75] **Lamb** y col. (2000) *Journal of Chromatography A* 894: 311-318.

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

[77] **Almeida** y **Alpar** (1996) *J. Drug Targeting* 3: 455-467.

[78] **Agarwal** y **Mishra** (1999) *Indian J Exp Biol* 37: 6-16.

[79] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell y Newman. ISBN: 030644867X. *Plenum*.

[80] WO00/23105.

[81] WO90/14837.

[82] Patente de Estados Unidos 5.057.540.

[83] WO96/33739.

[84] EP-A-0109942.

[85] WO96/11711.

[86] WO00/07621.

[87] **Barr** y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 247-271.

ES 2 329 059 T3

- [88] **Sjolanderet** y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 321-338.
- [89] **Niikura** y col. (2002) *Virology* 293: 273-280.
- 5 [90] **Lenz** y col. (2001) *J Immunol* 166: 5346-5355.
- [91] **Pinto** y col. (2003) *J Infect Dis* 188: 327-338.
- [92] **Gerber** y col. (2001) *Virol* 75: 4752-4760.
- 10 [93] WO03/024480
- [94] WO03/024481
- 15 [95] **Gluck** y col. (2002) *Vaccine* 20: B10-B16.
- [96] EP-A-0689454.
- [97] **Johnson** y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2273-2278.
- 20 [98] **Evans** y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2: 219-229.
- [99] **Meraldi** y col. (2003) *Vaccine* 21: 2485-2491.
- 25 [100] **Pajak** y col. (2003) *Vaccine* 21: 836-842.
- [101] **Kandimalla** y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31: 2393-2400.
- [102] WO02/26757.
- 30 [103] WO99/62923.
- [104] **Krieg** (2003) *Nature Medicine* 9: 831-835.
- 35 [105] **McCluskie** y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32: 179-185.
- [106] WO98/40100.
- [107] Patente de Estados Unidos 6.207.646.
- 40 [108] Patente de Estados Unidos 6.239.116.
- [109] Patente de Estados Unidos 6.429.199.
- 45 [110] **Kandimalla** y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3): 654-658.
- [111] **Blackwell** y col. (2003) *J Immunol* 170: 4061-4068.
- [112] **Krieg** (2002) *Trends Immunol* 23: 64-65.
- 50 [113] WO01/95935.
- [114] **Kandimalla** y col. (2003) *BBRC* 306: 948-953.
- 55 [115] **Bhagat** y col. (2003) *BBRC* 300: 853-861.
- [116] WO03/035836.
- [117] WO95/17211.
- 60 [118] WO98/42375.
- [119] **Beignon** y col. (2002) *Infect Immun* 70: 3012-3019.
- 65 [120] **Pizza** y col. (2001) *Vaccine* 19: 2534-2541.
- [121] **Pizza** y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290: 455-461.

- [122] **Scharton-Kersten** y col. (2000) *Infect Immun* 68: 5306-5313.
- [123] **Ryan** y col. (1999) *Infect Immun* 67: 6270-6280.
- 5 [124] **Partidos** y col. (1999) *Immunol Lett* 67: 209-216.
- [125] **Peppoloni** y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2: 285-293.
- [126] **Pine** y col. (2002) *J Control Release* 85: 263-270.
- 10 [127] **Domenighini** y col. (1995) *Mol Microbiol* 15: 1165-1167.
- [128] WO99/40936.
- [129] WO99/44636.
- 15 [130] **Singh** y col. (2001) *J Cont Release* 70: 267-276.
- [131] WO99/27960.
- 20 [132] Patente de Estados Unidos 6.090.406
- [133] Patente de Estados Unidos 5.916.588
- [134] EP-A-0626169.
- 25 [135] WO99/52549.
- [136] WO01/21207.
- 30 [137] WO01/21152.
- [138] **Andrianov** y col. (1998) *Biomaterials* 19: 109-115.
- 35 [139] **Payne** y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31: 185-196.
- [140] **Stanley** (2002) *Clin Exp Dermatol* 27: 571-577.
- [141] **Jones** (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4: 214-218.
- 40 [142] WO99/11241.
- [143] WO94/00153.
- 45 [144] WO98/57659.
- [145] Solicitudes de Patente Europea 0835318, 0735898 y 0761231.
- [146] WO03/009869.
- 50 [147] **Balmer** y **Borrow** (2004) *Expert Rev Vaccines* 3: 77-87.
- [148] **Kanra** y col. (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42: 421-427.
- 55 [149] **Ravenscroft** y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103: 35-47.
- [150] WO97/00697.
- [151] WO96/37222; Patente de Estados Unidos 6.333.036.
- 60 [152] **Watson** (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 331-332.
- [153] **Rubin** (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 269-285, v.
- 65 [154] **Jedrzejewski** (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 187-207.
- [155] **Zielen** y col. (2000) *Infect. Immun.* 68: 1435-1440.

ES 2 329 059 T3

[156] **Darkes y Plosker** (2002) *Paediatr Drugs* 4: 609-630.

[157] WO2004/032958

5 [158] **Podda** y col. (1991) *Vaccine* 9: 741-745.

[159] **Gerlich** y col. (1990) *Vaccine* 8 Suppl: S63-68 y 79-80.

[160] WO93/24148.

10

[161] **Sutter** y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 287-308.

[162] **Zimmerman y Spann** (1999) *Am Fam Physician* 59: 113-118, 125-126.

15

[163] **Bell** (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 1187-1188.

[164] **Iwarson** (1995) *APMIS* 103: 321-326.

20

[165] **Lyng y Betzon** (1987) *J Biol Stand* 15: 27-37.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición para inmunizar a un paciente contra una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis* que comprende al menos dos de: (a) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A y (ii) una proteína transportadora; (b) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C y (ii) una proteína transportadora; (c) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) una proteína transportadora; (d) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y y (ii) una proteína transportadora, **caracterizada** porque (1) al menos dos de dichos conjugados (a), (b), (c) y (d) usan la misma proteína transportadora ("el transportador común") y (2) la composición incluye el transportador común en una forma no conjugada, siendo la concentración del transportador común no conjugado menor de 10 µg/ml.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende un conjugado de los serogrupos tanto A como C.
3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende un conjugado de todos los serogrupos A, C, W135 e Y.
4. La composición de cualquier reivindicación anterior, en la que cada uno de los conjugados meningocócicos está conjugado con un transportador común seleccionado de: toxoide diftérico; toxoide tetánico; CRM197; y proteína D de *H. influenzae*.
5. La composición de la reivindicación 4, en la que el transportador común es toxoide diftérico.
6. La composición de la reivindicación 4, en la que el transportador común es proteína D de *H. influenzae*.
7. La composición de cualquier reivindicación anterior, en la que la masa de cada sacárido de serogrupo está entre 2 y 10 µg.
8. La composición de cualquier reivindicación anterior, en la que la masa de cada sacárido de serogrupo está en el +10% de cualquier otro.
9. La composición de cualquier reivindicación anterior, en la que la concentración del transportador común no conjugado es menor de 2 µg/ml.
10. La composición de cualquier reivindicación anterior, en la que la concentración total de transportador común en la composición es menor de 100 µg/ml.
11. La composición de cualquier reivindicación anterior, formulada para inyección intramuscular.
12. La composición de cualquier reivindicación anterior, que comprende además un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio.
13. La composición de cualquier reivindicación anterior, en la que la composición no incluye ningún material de mercurio.
14. La composición de cualquier reivindicación anterior, que comprende además uno o más de los siguientes antígenos adicionales: (i) un sacárido capsular conjugado de *Haemophilus influenzae* tipo B; (ii) un sacárido capsular conjugado de *Streptococcus pneumoniae*, (iii) un antígeno proteico de *N. meningitidis* serogrupo B; (iv) un antígeno de difteria; (v) un antígeno de tétanos; (vi) un antígeno de pertussis celular o de célula completa; (vii) uno o más antígenos de pertussis acelulares; (viii) un antígeno del virus de la hepatitis B; (ix) uno o más antígenos de poliovirus; (x) un antígeno de virus de la hepatitis A.
15. La composición de cualquier reivindicación anterior, en forma acuosa.
16. La composición de cualquier reivindicación anterior, en forma liofilizada.
17. La composición de cualquier reivindicación anterior, que comprende un alcohol de azúcar o sacarosa.
18. Un vial que contiene la composición de cualquier reivindicación anterior.
19. Una jeringa que contiene la composición de cualquier reivindicación anterior.
20. Un kit para preparar la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el kit comprende al menos un conjugado meningocócico en forma liofilizada y al menos un conjugado meningocócico en forma acuosa.
21. Un kit para preparar la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el kit comprende (i) la composición liofilizada de la reivindicación 16 y (ii) material acuoso, en el que el componente (ii) es para reconstituir el componente (i) para proporcionar la composición acuosa.

22. Un kit que comprende: (i) la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17; y (ii) una composición que comprende uno o más de los antígenos (i) a (x) como se define en la reivindicación 14.

23. Un procedimiento para preparar una composición para inmunizar a un paciente contra una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis*, que comprende las etapas de:

(1) preparar al menos dos de: (a) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A y (ii) una proteína transportadora; (b) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo C y (ii) una proteína transportadora; (c) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo W135 y (ii) una proteína transportadora; (d) un conjugado de (i) el sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo Y y (ii) una proteína transportadora, donde al menos dos de dichos conjugados (a), (b), (c) y (d) usan la misma proteína transportadora ("el transportador común"); y

(2) mezclar los al menos dos conjugados preparados en (1),

para dar una composición que incluye el transportador común en una forma no conjugada, siendo la concentración del transportador común no conjugado menor de 10 µg/ml.

24. Un procedimiento para preparar una composición para inmunizar a un paciente contra una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis*, que comprende las etapas de:

(1) seleccionar n serogrupos meningocócicos diferentes del grupo constituido por A, C, W135 e Y, donde el valor de n es 2, 3 ó 4 y después, para cada uno de los n serogrupos seleccionados, preparar un conjugado de (i) el sacárido capsular de ese serogrupo y (ii) una proteína transportadora, donde cada uno de los n conjugados usa la misma proteína transportadora ("el transportador común"); y

(2) mezclar los n conjugados preparados en la etapa (1) para proporcionar una composición que incluye el transportador común en una forma no conjugada,

siendo la concentración del transportador común no conjugado menor de 10 µg/ml.

25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que el valor de n es 2 ó 4.

26. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, que comprende además una o más etapas de medición de la cantidad de transportador común no conjugado.

27. El procedimiento de la reivindicación 26, que comprende una etapa de medición antes de la mezcla de los conjugados y/o una etapa de medición después de mezclar los conjugados.

28. Un procedimiento para evaluar la idoneidad de una composición para fabricación de vacuna y/o administración a seres humanos que comprende las etapas de realización (1) y (2) de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, y que comprende además la etapa de: (3) medir la concentración de transportador común no conjugado en la composición; y (4-i) si la concentración de transportador no conjugado es $<10 \mu\text{g/ml}$, aceptar la composición para fabricación adicional de vacuna y/o para administración a seres humanos; o (4-ii) si la concentración de transportador no conjugado es $\geq 10 \mu\text{g/ml}$, rechazar la composición.