

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 451**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2006 E 15189397 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.10.2021 EP 3009146**

54 Título: **Composición inmunogénica**

30 Prioridad:

27.06.2005 GB 0513069
27.06.2005 GB 0513071
28.07.2005 GB 0515556
28.11.2005 GB 0524204
21.12.2005 GB 0526040
21.12.2005 GB 0526041

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2022

73 Titular/es:

PFIZER IRELAND PHARMACEUTICALS (100.0%)
Operations Support Group
Ringaskiddy- Cork, IE

72 Inventor/es:

BIEMANS, RALPH, LEON;
BOUTRIAU, DOMINIQUE;
CAPIAU, CARINE;
DENOEL, PHILIPPE;
DUVIVIER, PIERRE y
POOLMAN, JAN

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 898 451 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición inmunogénica

La presente divulgación se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden sacáridos capsulares bacterianos conjugados con una proteína portadora, en particular aquellos sacáridos de *N. meningitidis*. Además, se refiere a vacunas y a kits de vacunas que comprenden dichos conjugados de sacáridos, a procesos para fabricar las composiciones inmunogénicas y las vacunas y al uso de las vacunas y las composiciones inmunogénicas de la invención en la terapia. También se refiere a los procedimientos de inmunización contra la infección mediante el uso de los conjugados de sacáridos y el uso de los conjugados de sacáridos en la fabricación de un medicamento.

Neisseria meningitidis es un patógeno humano Gram-negativo que causa la meningitis bacteriana. En base al 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 serogrupo A (MenA) es la causa más común de enfermedad epidémica en el África subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la mayoría de los casos en los países en desarrollo, mientras que el resto de los casos son causados por W135 e Y).

Las composiciones inmunogénicas que comprenden sacáridos de *N. meningitidis* conjugados con proteínas portadoras son conocidas en la técnica; la proteína portadora tiene el efecto conocido de convertir el antígeno polisacárido independiente de T en un antígeno dependiente de T capaz de desencadenar una respuesta de memoria inmunitaria. Por ejemplo, el documento WO 02/58737 desvela una vacuna que comprende polisacáridos capsulares purificados de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis* conjugados con una proteína portadora. Sin embargo, esta solicitud enseña que todos los polisacáridos se deben conjugar esencialmente de la misma manera (a través del mismo enlazador al mismo portador de proteínas).

Sigue siendo necesario desarrollar vacunas conjugadas mejoradas contra la meningitis neisérica. La presente divulgación se refiere a la provisión de una vacuna conjugada de polisacáridos meningocócicos en la que la conjugación de cada polisacárido está adaptada (en lugar de ser uniforme) para lograr una vacuna combinada eficaz. En particular, es ventajoso utilizar moléculas enlazadoras para conjugar ciertos sacáridos meningocócicos a sus portadores proteicos en combinación con otros que se conjugan directamente. De este modo, los polisacáridos que son menos inmunógenos se pueden presentar al sistema inmunitario a través de un enlazador, y los que son muy buenos inmunógenos se pueden conjugar directamente para que no dominen la respuesta inmunitaria a la combinación.

El documento WO 2004/103400 desvela una composición inmunogénica tetravalente que comprende MenA, MenC, MenW y MenY conjugados con un portador de toxoide diftérico.

En consecuencia, en un aspecto de la presente divulgación se proporciona una composición inmunogénica que comprende al menos 2 sacáridos capsulares diferentes de *N. meningitidis*, en la que uno o más se seleccionan de un primer grupo que consiste en MenA, MenC, MenY y MenW que se conjugan a través de un enlazador con una o varias proteínas portadoras, y uno o varios sacáridos diferentes se seleccionan de un segundo grupo que consiste en MenA, MenC, MenY y MenW que se conjugan directamente con una o varias proteínas portadoras.

En una vacuna MenAC, por ejemplo, MenA se puede conjugar a través de un enlazador y MenC directamente. En una vacuna MenCY, MenC se puede conjugar a través de un enlazador y MenY directamente. En una vacuna MenACWY, Men A se puede conjugar a través de un enlazador y MenCWY directamente, o MenAC se puede conjugar a través de un enlazador y MenWY directamente. En algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende al menos 2 sacáridos capsulares diferentes de *N. meningitidis* conjugados por separado con el mismo tipo de proteína portadora, en la que uno o más sacáridos se seleccionan de un primer grupo formado por MenA y MenC que se conjugan con la proteína portadora a través de un primer tipo de grupo químico en la portadora de proteínas, y uno o más sacáridos diferentes se seleccionan de un segundo grupo formado por MenC, MenY y MenW que se conjugan con la proteína portadora a través de un segundo tipo de grupo químico en la portadora de proteínas, en el que dicha composición comprende sacáridos capsulares MenA y MenC conjugados a través de un enlazador con una o varias proteínas portadoras, y sacáridos capsulares MenY y MenW conjugados directamente con una o varias proteínas portadoras, en el que el enlazador es ADH, y en el que la proteína portadora es TT.

En algunas realizaciones, el primer tipo de grupo químico es un grupo carboxilo en la portadora de proteínas, y el segundo tipo de grupo químico es un grupo amino en la portadora de proteínas.

Otra consideración en una vacuna combinada que comprenda varios sacáridos conjugados con el mismo portador es la cuestión de la inmunosupresión del portador: se puede utilizar demasiado portador y la respuesta inmune puede ser amortiguada. Con un enfoque uniforme de la conjugación, el portador presentará una mezcla similar de epítopos de células B y T al sistema inmunitario. Sin embargo, si la conjugación tiene lugar en diferentes grupos químicos dentro de la proteína portadora para un sacárido frente a otro, es probable que los portadores de proteínas sean diferentes hasta cierto punto en la forma en que se presentan al sistema inmunitario.

En consecuencia, en una realización separada de la divulgación se proporciona una composición inmunogénica que comprende al menos 2 sacáridos diferentes conjugados por separado con el mismo tipo de proteína portadora (por

ejemplo, toxoide tetánico), en la que uno o más sacáridos se conjugan con la proteína portadora a través de un primer tipo de grupo químico en la portadora de proteínas, y uno o más sacáridos se conjugan con la proteína portadora a través de un segundo tipo (diferente) de grupo químico en la portadora de proteínas.

5 El primer y el segundo tipo de grupo químico pueden estar presentes en la portadora de proteínas en un primer y un segundo conjunto de aminoácidos de la portadora de proteínas que se excluyen mutuamente (por ejemplo, ciertos residuos de ácido aspártico / ácido glutámico en un conjunto y ciertos residuos de lisina en el segundo). Un sacárido puede estar conjugado con un grupo carboxilo del portador y otro con un grupo amino, por ejemplo. Dicha conjugación puede implicar la conjugación en epítomos separados de células B y/o T para cada conjugado diferente.

10 Por ejemplo, en una vacuna MenAC, MenA puede estar unido a un primer tipo de grupo químico (tal como carboxilo) en la proteína portadora y MenC unido a un segundo (tal como amino). En una vacuna MenCY, MenC puede estar unido a un primer tipo de grupo químico (tal como carboxilo) en la proteína portadora y MenY unido a un segundo (tal como amino). En una vacuna MenACWY, MenAC puede estar unido a un primer tipo de grupo químico (tal como carboxilo) en la proteína portadora y MenWY unido a un segundo (tal como amino), o MenA puede estar unido a un primer tipo de grupo químico (tal como carboxilo) en la proteína portadora y MenCWY unido a un segundo (tal como amino).

15 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de inmunización de un huésped humano contra la enfermedad causada por *Neisseria meningitidis* que comprende la administración al huésped de una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna de la invención.

20 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una composición inmunogénica de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por *Neisseria meningitidis*.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un uso de la composición inmunogénica o vacuna de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por *Neisseria meningitidis*.

Descripción de los dibujos

25 **Figura 1 - A** - Gráfico de barras que muestra las respuestas de GMC en un ELISA anti-MenY. ENYTT012 es un conjugado MenY-TT preparado a partir del polisacárido nativo MenY. El ENYTT014 es un conjugado MenY-TT preparado a partir de un polisacárido MenY microfluidizado que ha sido sometido a 40 ciclos de microfluidización. El ENYTT015bis es un conjugado MenY-TT preparado a partir de un polisacárido MenY microfluidizado que ha sido sometido a 20 ciclos de microfluidización.

30 - B - Gráfico de barras que muestra las respuestas del GMT en un ensayo de SBA anti-MenY. ENYTT012 es un conjugado MenY-TT preparado a partir del polisacárido nativo MenY. El ENYTT014 es un conjugado MenY-TT preparado a partir de un polisacárido MenY microfluidizado que ha sido sometido a 40 ciclos de microfluidización. El ENYTT015bis es un conjugado MenY-TT preparado a partir de un polisacárido MenY microfluidizado que ha sido sometido a 20 ciclos de microfluidización.

35 Descripción detallada

En un aspecto de la presente divulgación se proporciona una composición inmunogénica que comprende al menos 2 sacáridos capsulares diferentes de *N. meningitidis*, en la que uno o más se seleccionan de un primer grupo que consiste en MenA, MenC, MenY y MenW que se conjugan a través de un enlazador con una o varias proteínas portadoras, y uno o varios sacáridos diferentes se seleccionan de un segundo grupo que consiste en MenA, MenC, MenY y MenW que se conjugan directamente con una o varias proteínas portadoras.

40 Más específicamente, el primer grupo puede consistir en MenA y MenC, y el segundo grupo consiste en MenC, MenY y MenW. Las realizaciones particulares de la divulgación son composiciones inmunogénicas que comprenden: sacárido capsular MenA conjugado por medio de un enlazador con una proteína portadora y sacárido capsular MenC directamente conjugado con una proteína portadora; sacárido capsular MenC conjugado por medio de un enlazador con una proteína portadora y sacárido capsular MenY directamente conjugado con una proteína portadora; sacáridos capsulares MenA y MenC conjugados por medio de un enlazador a una o varias proteínas portadoras y sacáridos capsulares MenY y Men W directamente conjugados a una o varias proteínas portadoras; sacárido capsular MenA conjugado por medio de un enlazador a una proteína portadora y sacáridos capsulares MenC, MenY y Men W directamente conjugados a una o varias proteínas portadoras. En cualquiera de estas realizaciones también se puede incluir un conjugado de Hib, que está unido a una proteína portadora (véase la lista de portadores arriba y abajo, por ejemplo TT) directamente o a través de un enlazador.

55 El término "sacárido" a lo largo de esta memoria descriptiva puede indicar polisacárido u oligosacárido e incluye ambos. Los polisacáridos se aíslan de las bacterias o se aíslan de las bacterias y se dimensionan en cierta medida por procedimientos conocidos (véanse, por ejemplo, los documentos EP497524 y EP497525) y opcionalmente por medio de microfluidización. Los polisacáridos se pueden dimensionar a fin de reducir la viscosidad en las muestras de polisacáridos y/o para mejorar la filtrabilidad de los productos conjugados. Los oligosacáridos tienen un bajo número

de unidades de repetición (normalmente entre 5 y 30 unidades de repetición) y suelen ser polisacáridos hidrolizados.

Cada sacárido capsular de *N. meningitidis* (y/o Hib) se puede conjugar con una proteína portadora seleccionada independientemente del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT y proteína D. A continuación se presenta una lista más completa de portadores de proteínas que se pueden utilizar en los conjugados de la divulgación.

5 Aunque uno o más sacáridos capsulares de *N. meningitidis* (y/o Hib) pueden estar conjugados con proteínas portadoras diferentes de las demás, en una realización todos están conjugados con la misma proteína portadora. Por ejemplo, todas ellas se pueden conjugar con la misma proteína portadora seleccionada del grupo formado por TT, DT, CRM197, el fragmento C de TT y la proteína D. En este contexto, CRM197 y DT se pueden considerar como la misma proteína portadora, dado que sólo difieren en un aminoácido. En una realización, todos los sacáridos capsulares de
10 *N. meningitidis* (y/o Hib) presentes están conjugados con TT.

Si la portadora de proteínas es el mismo para 2 o más sacáridos en la composición, el sacárido podría estar conjugado a la misma molécula de la portadora de proteínas (moléculas de portador que tienen 2 sacáridos más diferentes conjugados a él) [véase por ejemplo WO 04/083251 por ejemplo, una sola proteína portadora podría conjugarse con MenA y MenC; MenA y MenW; MenA y MenY; MenC y MenW; MenC y MenY; Men W y MenY; MenA, MenC y MenW; MenA, MenC y MenY; MenA, MenW y MenY; MenC, MenW y MenY; MenA, MenC, MenW y MenY; Hib y MenA; Hib y MenC; Hib y MenW; o Hib y MenY]. Alternativamente, los sacáridos pueden ser conjugados por separado a diferentes moléculas de la portadora de proteínas (cada molécula de la portadora de proteínas sólo tiene un tipo de sacárido conjugado a ella).

15 Las composiciones inmunogénicas del primer aspecto de la divulgación también pueden tener alguna o todas las características adicionales del segundo aspecto de la divulgación y viceversa.

En un segundo aspecto de la divulgación se presenta una composición inmunogénica que comprende al menos 2 conjugados de sacáridos diferentes conjugados por separado con el mismo tipo de proteína portadora, en la que uno o más sacáridos se conjugan con la proteína portadora a través de un primer tipo de grupo químico en la portadora de proteínas, y uno o más sacáridos se conjugan con la proteína portadora a través de un segundo tipo (diferente) de grupo químico en la portadora de proteínas.

20 En una realización los 2 conjugados implican el mismo sacárido unido al mismo portador, pero por diferentes químicas de conjugación. En una realización alternativa, dos sacáridos diferentes se conjugan con diferentes grupos en la portadora de proteínas.

Por "conjugado por separado al mismo tipo de proteína portadora" se entiende que los sacáridos se conjugan al mismo portador individualmente (por ejemplo, MenA se conjuga al toxoide tetánico a través de un grupo amina en el toxoide tetánico y MenC se conjuga al toxoide tetánico a través de un grupo ácido carboxílico en una molécula diferente de toxoide tetánico)

Los sacáridos capsulares se pueden conjugar con la misma proteína portadora seleccionada independientemente del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT y proteína D. A continuación se presenta una lista más completa de los portadores de proteínas que se pueden utilizar en los conjugados. En este contexto, se puede considerar que la CRM197 y la DT son la misma proteína portadora, dado que sólo difieren en un aminoácido. En una realización, todos los sacáridos capsulares presentes están conjugados con TT.

En una realización, el primer y segundo tipo de grupo químico en la portadora de proteínas están presentes en epítomos separados de células B y/o T en la proteína portadora. Es decir, están presentes en un conjunto de epítomos de células B y/o T diferentes entre sí. Para predecir los epítomos de las células B para un portador se pueden utilizar procedimientos conocidos, tales como uno o ambos de los dos procedimientos siguientes: Predicción de la estructura 2D y/o predicción del índice antigénico. La predicción de la estructura en 2D se puede hacer con el programa PSIPRED (de David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK). El índice antigénico se puede calcular sobre la base del procedimiento descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4:181 a 186 [1988]). Los parámetros utilizados en este programa son el índice antigénico y la longitud mínima para un péptido antigénico. Un índice antigénico de 0,9 para un mínimo de 5 aminoácidos consecutivos se puede utilizar como los umbrales en el programa. Los epítomos de las células T auxiliares son péptidos unidos a las moléculas HLA de clase II y reconocidos por las células T auxiliares. La predicción de epítomos útiles de células T auxiliares se puede basar en técnicas conocidas, tales como el procedimiento TEPITOPE descrito por Sturniolo *et al.* (*Nature Biotech.* 17: 555 a 561 [1999]).

Los sacáridos se pueden seleccionar de un grupo que consiste en: Sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo A (MenA), sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C (MenC), sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y (MenY), sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo W (MenW), sacárido capsular de *H. influenzae* tipo b (Hib), Streptococcus del grupo B grupo I sacárido capsular, Streptococcus del grupo B grupo II sacárido capsular, Streptococcus del grupo B grupo III sacárido capsular, Sacárido capsular del grupo B de Streptococcus, sacárido capsular del grupo V de Streptococcus, sacárido capsular del tipo 5 de *Staphylococcus aureus*, sacárido capsular del tipo 8 de *Staphylococcus aureus*, sacárido Vi de *Salmonella typhi*, *N. meningitidis* LPS (tales como L3 y/o L2), *M. catarrhalis* LPS, *H. influenzae* LPS, y de cualquiera de los sacáridos capsulares del neumococo tales como del serotipo

1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F o 33F. En una realización, la composición inmunogénica de la divulgación consiste o comprende dos o más sacáridos diferentes del mismo género de bacterias (por ejemplo, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* o *Haemophilus*).

5 El primer y el segundo grupo químico presentes en la portadora de proteínas son diferentes entre sí e idealmente son grupos químicos naturales que se pueden utilizar fácilmente para fines de conjugación. Se pueden seleccionar independientemente del grupo que consiste en: grupos carboxilo, grupos amino, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo, grupos imidazolilo, grupos guanidilo y grupos indolilo. En una realización el primer grupo químico es carboxilo y el segundo es amino, o viceversa. Estos grupos se explican con más detalle a continuación.

10 En una realización específica, la composición inmunogénica comprende al menos 2 sacáridos capsulares diferentes de *N. meningitidis*, en los que uno o más se seleccionan de un primer grupo que consiste en MenA y MenC que se conjugan con la proteína portadora a través del primer tipo de grupo químico en la portadora de proteínas (por ejemplo, carboxilo), y uno o más sacáridos diferentes se seleccionan de un segundo grupo que consiste en MenC, MenY y MenW que se conjugan con la proteína portadora a través del segundo tipo de grupo químico en la portadora de proteínas (por ejemplo, amino).

15 En otra realización, la composición inmunogénica de la divulgación comprende MenA conjugado a través del primer tipo de grupo químico (por ejemplo, carboxilo), y MenC conjugado a través del segundo tipo de grupo químico (por ejemplo, amino).

En otra realización, la composición inmunogénica comprende MenC conjugado a través del primer tipo de grupo químico (por ejemplo, carboxilo), y MenY conjugado a través del segundo tipo de grupo químico (por ejemplo, amino).

20 En otra realización, la composición inmunogénica comprende MenA conjugado a través del primer tipo de grupo químico (por ejemplo, carboxilo), y MenC, MenY y MenW conjugados a través del segundo tipo de grupo químico (por ejemplo, amino).

25 En otra realización, la composición inmunogénica comprende MenA y MenC conjugados por medio del primer tipo de grupo químico (por ejemplo, carboxilo), y MenY y MenW conjugados por medio del segundo tipo de grupo químico (por ejemplo, amino).

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el Hib también puede estar presente conjugado con el mismo tipo de portador de proteínas. El Hib puede estar conjugado al portador por el primer o segundo tipo de grupo químico. En una realización se conjuga a través de un grupo carboxilo.

Consideraciones generales sobre los aspectos de la divulgación

30 Los sacáridos de la divulgación (en particular los sacáridos de *N. meningitidis* y/o el sacárido capsular de Hib) incluidos en las composiciones farmacéuticas (inmunogénicas) de la divulgación se conjugan con una proteína portadora tal como el toxoide tetánico (TT), el fragmento C del toxoide tetánico mutantes no tóxicos de la toxina tetánica [nótese que todas estas variantes de TT se consideran el mismo tipo de proteína portadora a efectos de la divulgación toxoide diftérico (DT), CRM197, otros mutantes no tóxicos de la toxina diftérica [tales como CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida *et al.* *J. Biol. Chem.* 218; 3838 a 3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en *Genetically Engineered Toxins*, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; supresión o mutación de Glu-148 por Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 por Gly y otras mutaciones desveladas en el documento US 4709017 o US 4950740 mutación de al menos uno o más residuos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones desveladas en el documento US 5917017 o en US 6455673o fragmento desvelado en el documento US 5843711] (nótese que todas estas variantes de DT se consideran el mismo tipo de proteína portadora a efectos de esta divulgación), neumolisina neumocócica (Kuo *et al.* (1995) *Infect. Immun.* 63; 2706 a 2713), OMPC (proteína de la membrana externa meningocócica - normalmente extraída de *N. meningitidis* serogrupo B -) EP0372501), péptidos sintéticos (los documentos EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (los documentos WO 93/17712, WO 94/03208), las proteínas de la tos ferina (los documentos WO 98/58668, EP0471177), 45 citoquinas, linfocinas, factores de crecimiento u hormonas (el documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células T CD4+ humanas de varios antígenos derivados de patógenos (Falugi *et al.* (2001) *Eur. J. Immunol.* 31; 3816 a 3824) tal como la proteína N19 (Baraldoi *et al.* (2004) *Infect. Immun.* 72; 4884 a 4887) la proteína de superficie neumocócica PspA (el documento WO 02/091998), las proteínas de captación de hierro (el documento WO 01/72337), la toxina A o B de *C. difficile* (el documento WO 00/61761) o la proteína D (los documentos EP594610 y WO 00/56360).

55 En una realización, la composición inmunogénica de la divulgación utiliza el mismo tipo de proteína portadora (independientemente) en al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los sacáridos (por ejemplo, sacáridos capsulares de *N. meningitidis* y/o Hib) contenidos en ella. En una realización en la que están presentes los sacáridos capsulares de Hib y *N. meningitidis*, el Hib puede estar conjugado con el mismo tipo de proteína portadora que al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los sacáridos de *N. meningitidis*. Por ejemplo, 2, 3 o 4 de los sacáridos de *N. meningitidis* (MenA,C,Y,W) se conjugan independientemente con el toxoide tetánico para hacer 2, 3 o 4 conjugados, y opcionalmente el Hib también se conjuga con el TT.

- En una realización, la composición inmunogénica de la divulgación comprende un sacárido de *N. meningitidis* conjugado con una proteína portadora seleccionada del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT y proteína D. En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende un sacárido de Hib conjugado con una proteína portadora seleccionada del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT y proteína D.
- La composición inmunogénica de la divulgación opcionalmente comprende al menos un sacárido meningocócico (por ejemplo, MenA; MenC; MenW; MenY; MenA y MenC; MenA y MenW; MenA y MenY; MenC y Men W; Men C y MenY; Men W y MenY; MenA, MenC y MenW; MenA, MenC y MenY; MenA, MenW y MenY; MenC, MenW y MenY o MenA, MenC, MenW y MenY) conjugado con una proporción de sacárido Men respecto a la proteína portadora de entre 15 y 5:1, entre 1:2 y 5:1, entre 1:05 y 1:2,5 o entre 1:1,25 y 1:2,5(p/p).
- La composición inmunogénica de la divulgación opcionalmente comprende un conjugado de sacáridos de Hib que tiene una proporción de Hib con respecto a la proteína portadora de entre 1:5 y 5:1; 1:2 y 2:1; 1:1 y 1:4; 1:2 y 1:3,5; o aproximadamente o exactamente 1:2,5 o 1:3 (p/p).
- La proporción entre el sacárido y la proteína portadora (p/p) en un conjugado se puede determinar mediante el uso del conjugado esterilizado. La cantidad de proteínas se determina por medio de un ensayo de Lowry (por ejemplo, Lowry *et al.* (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265 a 275 o Peterson *et al.* *Analytical Biochemistry* 100, 201 a 220 (1979)) y la cantidad de sacárido se determina por medio de ICP-OES (espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente) para MenA, ensayo DMAP para MenC y ensayo Resorcinol para MenW y MenY (Monsigny *et al.* (1988) *Anal. Biochem.* 175, 525 a 530).
- En una realización, la composición inmunogénica de la divulgación comprende conjugados de sacárido de *N. meningitidis* y/o el conjugado de sacárido de Hib, en el que los sacáridos de *N. meningitidis* y/o el sacárido de Hib se conjugan con la proteína portadora a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador bifuncional. El enlazador es opcionalmente heterobifuncional u homobifuncional, que tiene, por ejemplo, un grupo amino reactivo y un grupo de ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amino reactivos o dos grupos de ácido carboxílico reactivos. El enlazador tiene, por ejemplo, entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un posible enlazador es ADH. Otros enlazadores son el B-propionamido (WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gever *et al.* (1979) *Med. Microbiol. Immunol.* 165; 171 a 288), haluros de haloalquilo (el documento US4057685), enlaces glicosídicos (los documentos US4673574, US4808700), diamina de hexano y ácido 6-aminocaproico (el documento US4459286).
- Los conjugados de sacáridos presentes en las composiciones inmunogénicas de la divulgación se pueden preparar por medio de cualquier técnica de acoplamiento conocida. El procedimiento de conjugación puede estar basado en la activación del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. De este modo, el sacárido activado se puede acoplar directamente o a través de un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino de la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para dar un polisacárido tiolado que se podría acoplar al portador a través de un enlace tioéter obtenido tras la reacción con una proteína portadora activada por maleimida (por ejemplo, mediante el uso de GMBS) o una proteína portadora holoacetilada (por ejemplo, mediante el uso de yodoacetimida o bromoacetato de N-succinimidilo). Opcionalmente, el éster de cianato (opcionalmente hecho por la química CDAP) se acopla con hexano diamina o ADH y el sacárido amino-derivado se conjuga con la proteína portadora mediante el uso de la química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) a través de un grupo carboxilo en la proteína portadora. Tales conjugados se describen en la Solicitud publicada en el PCT WO 93/15760 de la Universidad de Servicios Uniformados y los documentos WO 95/08348 y WO 96/29094.
- Otras técnicas adecuadas utilizan carbiinidas, hidrazidas, esteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en el documento WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador carbonilo que se puede formar por reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (Bethell *et al.* *J. Biol. Chem.* 1979, 254; 2572 a 2574, Hearn *et al.* *J. Chromatogr.* 1981. 218; 509 a 518) seguido por una reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Esto puede implicar la reducción del extremo anomérico a un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermedio de carbamato de CDI y el acoplamiento del intermedio de carbamato de CDI con un grupo amino en una proteína.
- Los conjugados también se pueden preparar por procedimientos de aminación reductora directa como se describe en los documentos US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). Otros procedimientos se describen en los documentos EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508.
- Otro procedimiento consiste en el acoplamiento de un sacárido activado con bromuro de cianógeno (o CDAP) derivado con hidrazida de ácido adípico (ADH) al portador de proteínas por medio de la condensación de carbodiimida (Chu C. *et al.* *Infect. Immunity*, 1983; 245 a 256), por ejemplo, mediante el uso de EDAC.
- En una realización, un grupo hidroxilo (opcionalmente un grupo hidroxilo activado, por ejemplo, un grupo hidroxilo activado por un éster de cianato) en un sacárido está vinculado a un grupo amino o carboxílico en una proteína, ya sea directa o indirectamente (a través de un enlazador). Cuando hay un enlazador, un grupo hidroxilo de un sacárido

5 se une opcionalmente a un grupo amino de un enlazador, por ejemplo, por medio de la conjugación CDAP. Un grupo amino adicional en el enlazador (por ejemplo, ADH) se puede conjugar con un grupo de ácido carboxílico en una proteína, por ejemplo, mediante el uso de la química de carbodiimida, por ejemplo, mediante el uso de EDAC. En una realización, los sacáridos capsulares de Hib o *N. meningitidis* (o el sacárido en general) se conjugan primero con el enlazador antes de que éste se conjugue con la proteína portadora. Alternativamente, el enlazador se puede conjugar con el portador antes de la conjugación con el sacárido.

En general, los siguientes tipos de grupos químicos en un portador de proteínas se pueden utilizar para el acoplamiento/conjugación:

10 A) Carboxilo (por ejemplo, a través del ácido aspártico o del ácido glutámico). En una realización, este grupo está vinculado a grupos aminos en los sacáridos directamente o a un grupo amino en un enlazador con química de carbodiimida, por ejemplo, con EDAC.

15 B) Grupo amino (por ejemplo, a través de la lisina). En una realización, este grupo se une a los grupos carboxilo de los sacáridos directamente o a un grupo carboxilo de un enlazador con química de carbodiimida, por ejemplo, con EDAC. En otra realización, este grupo está vinculado a grupos hidroxilos activados con CDAP o CNBr en sacáridos directamente o a tales grupos en un enlazador; a sacáridos o enlazadores que tienen un grupo aldehído; a sacáridos o enlazadores que tienen un grupo éster succinimida.

C) Sulfidrilo (por ejemplo, a través de la cisteína). En una realización, este grupo está vinculado a un sacárido bromo o cloro acetilado o a un enlazador con química maleimida. En una realización este grupo se activa/modifica con bis diazobenzidina.

20 D) Grupo hidroxilo (por ejemplo, a través de la tirosina). En una realización este grupo se activa/modifica con bis diazobenzidina.

E) Grupo imidazolilo (por ejemplo, a través de la histidina). En una realización este grupo se activa/modifica con bis diazobenzidina.

F) Grupo guanidilo (por ejemplo, a través de la arginina).

25 G) Grupo indolilo (por ejemplo, a través del triptófano).

En un sacárido, en general se pueden utilizar los siguientes grupos para un acoplamiento: OH, COOH o NH₂. Los grupos aldehídos se pueden generar después de diferentes tratamientos conocidos en la técnica tales como: periodato, hidrólisis ácida, peróxido de hidrógeno, etc.

Enfoques de acoplamiento directo:

30 Sacárido-OH + CNBr o CDAP ----> éster de cianato + NH₂-Prot ----> conjugado Sacarido-aldehído + NH₂-Prot ----> base de Schiff + NaCNBH₃ ----> conjugado Sacarido-COOH + NH₂-Prot + EDAC ----> conjugado Sacarido-NH₂ + COOH-Prot + EDAC ----> conjugado

Acoplamiento indirecto por medio de enfoques de espaciadores (enlazadores):

35 Sacárido-OH + CNBr o CDAP ---> éster de cianato + NH₂----NH₂ ----> sacáridoNH₂ + COOH-Prot + EDAC ----> conjugado

Sacárido-OH + CNBr o CDAP ----> éster de cianato + NH₂----SH ----> sacárido----SH + SH-Prot (proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida tras la modificación de los grupos amino de la proteína por medio de SPDP, por ejemplo) ----> sacárido-S-S-Prot

40 Sacárido-OH + CNBr o CDAP ---> éster de cianato + NH₂----SH ----> sacárido----SH + maleimida-Prot (modificación de grupos aminos) ----> conjugado

Sacárido-COOH + EDAC + NH₂----NH₂ ---> sacárido----NH₂ + EDAC + COOH-Prot ----> conjugado

Sacárido-COOH + EDAC+ NH₂----SH ----> sacárido----SH + SH-Prot (Proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida tras la modificación de los grupos aminos de la proteína por SPDP, por ejemplo) ----> sacárido-S-S-Prot

45 Sacárido-COOH + EDAC+ NH₂----SH ----> sacárido----SH + maleimida-Prot (modificación de grupos aminos) ----> conjugado

Sacárido-Aldehído + NH₂----NH₂ ----> sacárido---NH₂ + EDAC + COOH-Prot ----> conjugado

Nota: en lugar del EDAC anterior, se puede utilizar cualquier carbodiimida adecuada.

En resumen, los tipos de grupos químicos portadores de proteínas que se pueden utilizar generalmente para el acoplamiento con un sacárido son grupos amino (por ejemplo, en los residuos de lisina), grupos COOH (por ejemplo,

en los residuos de ácido aspártico y glutámico) y grupos SH (si son accesibles) (por ejemplo, en los residuos de cisteína).

5 En una realización, el sacárido Hib, cuando está presente, se conjuga con la proteína portadora mediante el uso de CNBr, o CDAP, o una combinación de CDAP y química de carbodiimida (tal como EDAC), o una combinación de CNBr y química de carbodiimida (tal como EDAC). Opcionalmente, el Hib se conjuga mediante el uso de CNBr y química de carbodiimida, opcionalmente EDAC. Por ejemplo, se utiliza CNBr para unir el sacárido y el enlazador y luego se utiliza la química de la carbodiimida para unir el enlazador a la portadora de proteínas.

10 En una realización, al menos uno de los sacáridos capsulares de *N. meningitidis* (o el sacárido en general) se conjuga directamente con una proteína portadora; opcionalmente, los sacáridos Men W y/o MenY y/o MenC se conjugan directamente con una proteína portadora. Por ejemplo, MenW; MenY; MenC; MenW y MenY; MenW y MenC; MenY y MenC; o MenW, MenY y MenC están directamente vinculados a la proteína portadora. Opcionalmente, al menos uno de los sacáridos capsulares de *N. meningitidis* se conjuga directamente con CDAP. Por ejemplo, MenW; MenY; MenC; MenW y MenY; MenW y MenC; MenY y MenC; o MenW, MenY y MenC están directamente unidos a la proteína portadora por CDAP (véase WO 95/08348 y WO 96/29094). En una realización, todos los sacáridos capsulares de *N. meningitidis* están conjugados con toxoide tetánico.

15 En una realización, la proporción del sacárido Men W y/o Y con respecto a la proteína portadora está entre 1:0,5 y 1:2 (p/p) y/o la proporción del sacárido MenC con respecto a la proteína portadora está entre 1:0,5 y 1:4 o 1:0,5 y 1:1,5 (p/p), especialmente cuando estos sacáridos están directamente unidos a la proteína, opcionalmente mediante el uso de CDAP.

20 En una realización, al menos uno de los sacáridos capsulares de *N. meningitidis* (o sacáridos en general) se conjuga con la proteína portadora por medio de un enlazador, por ejemplo un enlazador bifuncional. El enlazador es opcionalmente heterobifuncional u homobifuncional, que tiene, por ejemplo, un grupo amina reactivo y un grupo ácido carboxílico reactivo, 2 grupos amina reactivos o 2 grupos ácido carboxílico reactivos. El enlazador tiene, por ejemplo, entre 4 y 20, 4 y 12, 5 y 10 átomos de carbono. Un posible enlazador es ADH.

25 En una realización, MenA; MenC; o MenA y MenC se conjugan con una proteína portadora (por ejemplo, toxoide tetánico) a través de un enlazador.

30 En una realización, al menos un sacárido de *N. meningitidis* se conjuga con una proteína portadora a través de un enlazador mediante el uso de CDAP y EDAC. Por ejemplo, MenA; MenC; o MenA y MenC se conjugan con una proteína a través de un enlazador (por ejemplo, los que tienen dos grupos hidrazino en sus extremos, tales como ADH) mediante el uso de CDAP y EDAC como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el CDAP se utiliza para conjugar el sacárido con un enlazador y el EDAC se utiliza para conjugar el enlazador con una proteína. Opcionalmente, la conjugación a través de un enlazador da lugar a una proporción de sacárido a proteína portadora de entre 1:0,5 y 1:6; 1:1 y 1:5 o 1:2 y 1:4, para MenA; MenC; o MenA y MenC.

35 En una realización, el sacárido capsular MenA, cuando está presente, está al menos parcialmente acetilado en O, de forma que al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las unidades de repetición están acetiladas en O en al menos una posición. La acetilación en O está presente, por ejemplo, en la posición O-3 de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las unidades de repetición.

40 En una realización, el sacárido capsular de MenC, cuando está presente, está al menos parcialmente acetilado en O, de forma que al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las unidades de repetición de NeuNAc enlazadas ($\alpha 2 \rightarrow 9$) están acetiladas en O en al menos una o dos posiciones. La acetilación en O está presente, por ejemplo, en la posición O-7 y/o O-8 en al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las unidades de repetición.

45 En una realización, el sacárido capsular MenW, cuando está presente, está al menos parcialmente acetilado en O, de forma que al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las unidades de repetición están acetiladas en al menos una o dos posiciones. La acetilación en O está presente, por ejemplo, en la posición O-7 y/o O-9 en al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las unidades de repetición.

50 En una realización, el sacárido capsular MenY, cuando está presente, está al menos parcialmente acetilado en O, de forma que al menos el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las unidades de repetición están acetiladas en al menos una o dos posiciones. La acetilación en O está presente en la posición 7 y/o 9 de al menos el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las unidades de repetición.

El porcentaje de acetilación en O se refiere al porcentaje de las unidades de repetición que contienen acetilación en O. Esto se puede medir en el sacárido antes del conjugado y/o después de la conjugación.

55 En una realización de la invención, la composición inmunogénica, el sacárido presente, o cada sacárido capsular de *N. meningitidis* presente, se conjuga con TT. En otra realización, cada sacárido capsular de *N. meningitidis* se conjuga por separado con una proteína portadora distinta. En otra realización, cada conjugado de sacárido capsular de *N. meningitidis* tiene una proporción de sacárido:portador de 1:5 a 5:1 o de 1:1 a 1:4(p/p). En otra realización, al menos

uno, dos o tres conjugados de sacáridos capsulares de *N. meningitidis* se conjugan directamente con una proteína portadora. En otra realización, Men W y/o MenY, MenW y/o MenC, MenY y/o MenC, o MenW y MenC y MenY se conjugan directamente con una proteína portadora. En otra realización, al menos uno, dos o tres conjugados de sacáridos de *N. meningitidis* se conjugan directamente por medio de la química CDAP. En otra realización, la proporción entre el sacárido Men W y/o Y y la proteína portadora está entre 1:0,5 y 1:2 (p/p). En otra realización, la proporción entre el sacárido MenC y la proteína portadora está entre 1:0,5 y 1:2 (p/p). En otra realización, al menos uno, dos o tres sacáridos capsulares de *N. meningitidis* se conjugan con la proteína portadora a través de un enlazador (que puede ser bifuncional, tal como con dos grupos amino reactivos (tales como ADH) o dos grupos carboxilo reactivos, o un grupo amino reactivo en un extremo y un grupo carboxilo reactivo en el otro). El enlazador puede tener entre 4 y 12 átomos de carbono. En otra realización, el o los sacáridos capsulares de *N. meningitidis* conjugados a través de un enlazador se conjugan con el enlazador por medio de la química CDAP. En otra realización, la proteína portadora se conjuga con el enlazador mediante el uso de la química de la carbodiimida, por ejemplo, mediante el uso de EDAC. En otra realización, el o cada sacárido capsular de *N. meningitidis* se conjuga con el enlazador antes de que la proteína portadora se conjuge con el enlazador. En otra realización, MenA se conjuga con una proteína portadora a través de un enlazador (la proporción entre el sacárido MenA y la proteína portadora puede estar entre 1:2 y 1:5 (p/p)). En otra realización, MenC se conjuga con una proteína portadora a través de un enlazador (la proporción entre el sacárido MenC y la proteína portadora puede estar entre 1:2 y 1:5 (p/p)).

Los inventores también han observado que el enfoque de la técnica ha sido utilizar oligosacáridos para facilitar la producción de conjugados. Los inventores han descubierto que mediante el uso de conjugados de polisacáridos nativos o ligeramente dimensionados, se pueden obtener una o más de las siguientes ventajas: 1) un conjugado que tenga una alta inmunogenicidad que sea filtrable a través de un filtro de 0,2 micrómetros; 2) la memoria inmunitaria se puede mejorar (como en el ejemplo tres); 3) la alteración de la proporción entre polisacáridos y proteínas en el conjugado, de forma que la proporción entre polisacáridos y proteínas (p/p) en el conjugado se puede aumentar (esto puede dar lugar a una reducción del efecto de supresión del portador); 4) los conjugados inmunogénicos propensos a la hidrólisis (tales como los conjugados MenA) se pueden estabilizar mediante el uso de polisacáridos más grandes para la conjugación. El uso de polisacáridos más grandes puede dar lugar a una mayor reticulación con el portador del conjugado y puede disminuir la liberación de sacáridos libres del conjugado. Las vacunas conjugadas descritas en el estado de la técnica tienden a despolimerizar los polisacáridos antes de la conjugación a fin de mejorarla. Los presentes inventores han descubierto que las vacunas conjugadas contra el meningococo (o sacárido) que conservan un mayor tamaño de sacárido pueden proporcionar una buena respuesta inmunitaria contra la enfermedad meningocócica.

La composición inmunogénica de la invención de este modo puede comprender uno o más conjugados de sacáridos en los que el tamaño promedio de cada sacárido antes de la conjugación es superior a 50kDa, 75kDa, 100kDa, 110kDa, 120kDa o 130kDa. En una realización, el conjugado posterior a la conjugación se debe poder filtrar fácilmente a través de un filtro de 0,2 micrómetros, de forma que se obtenga un rendimiento superior al 50, 60, 70, 80, 90 o 95% después de la filtración en comparación con la muestra previa a la misma.

En particular, la composición inmunogénica de la invención comprende sacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína portadora, en la que el tamaño promedio (peso molecular promedio en peso; Mw) de al menos uno, dos, tres o cuatro o cada sacárido de *N. meningitidis* es superior a 50kDa, 60kDa, 75kDa, 100kDa, 110kDa, 120kDa o 130kDa.

La composición inmunogénica puede comprender sacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína portadora, en la que al menos uno, dos, tres o cuatro o cada sacárido de *N. meningitidis* es un sacárido nativo o está dimensionado por un factor de hasta x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 o x10 en relación con el peso molecular promedio del polisacárido nativo.

Para los fines de la invención, "polisacárido nativo" se refiere a un sacárido que no ha sido sometido a un proceso cuyo propósito es reducir el tamaño del sacárido. Un polisacárido se puede reducir ligeramente en tamaño durante los procedimientos normales de purificación. Dicho sacárido sigue siendo nativo. Sólo si el polisacárido ha sido sometido a técnicas de dimensionamiento, el polisacárido no se consideraría nativo.

Para los fines de la invención, "dimensionado por un factor de hasta x2" significa que el sacárido se somete a un proceso destinado a reducir el tamaño del sacárido pero a conservar un tamaño superior a la mitad del tamaño del polisacárido nativo. X3, x4, etc. se deben interpretar de la misma manera, es decir, que el sacárido se somete a un proceso destinado a reducir el tamaño del polisacárido, pero para mantener un tamaño superior a un tercio, un cuarto, etc. del tamaño del polisacárido nativo.

En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína portadora, en la que al menos uno, dos, tres o cuatro o cada sacárido de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo.

En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína portadora, en la que al menos uno, dos, tres o cuatro o cada uno de los sacáridos de *N. meningitidis* tiene un tamaño de hasta x1,5, x2, x3,

x4, x5, x6, x7, x8, x9 o x10.

Las composiciones inmunogénicas de la divulgación comprenden opcionalmente conjugados de : *N. meningitidis* serogrupo C sacárido capsular (MenC), serogrupo A sacárido capsular (MenA), serogrupo W135 sacárido capsular (MenW), serogrupo Y sacárido capsular (MenY), serogrupo C y Y sacáridos capsulares (MenCY), serogrupo C y A sacáridos capsulares (MenAC), sacáridos capsulares del serogrupo C y W (MenCW), sacáridos capsulares del serogrupo A e Y (MenAY), sacáridos capsulares del serogrupo A y W (MenAW), sacáridos capsulares del serogrupo W e Y (Men WY), sacáridos capsulares del serogrupo A, C y W (MenACW), sacáridos capsulares del serogrupo A, C e Y (MenACY); sacáridos capsulares del serogrupo A, W135 e Y (MenAWY), sacáridos capsulares del serogrupo C, W135 e Y (MenCWY); o sacáridos capsulares del serogrupo A, C, W135 e Y (MenACWY). Esta es la definición de “uno, dos, tres o cuatro”, o “al menos uno de” los serogrupos A, C, W e Y, o de cada uno de los sacáridos de *N. meningitidis* que se mencionan en la presente memoria.

En una realización, el tamaño promedio de al menos uno, dos, tres, cuatro o cada uno de los sacáridos de *N. meningitidis* está comprendido entre 50kDa y 1500kDa, 50kDa y 500kDa, 50 kDa y 300 KDa, 101kDa y 1500kDa, 101kDa y 500kDa, 101kDa y 300kDa de acuerdo con lo determinado por MALLS.

En una realización, el sacárido MenA, cuando está presente, tiene un peso molecular de 50 a 500kDa, de 50 a 100kDa, de 100 a 500kDa, de 55 a 90kDa, de 60 a 70kDa o de 70 a 80kDa o de 60 a 80kDa.

En una realización, el sacárido MenC, cuando está presente, tiene un peso molecular de 100 a 200kDa, de 50 a 100kDa, de 100 a 150kDa, de 101 a 130kDa, de 150 a 210kDa o de 180 a 210kDa.

En una realización, el sacárido MenY, cuando está presente, tiene un peso molecular de 60 a 190kDa, de 70 a 180kDa, de 80 a 170kDa, de 90 a 160kDa, de 100 a 150kDa o de 110 a 140kDa, de 50 a 100kDa, de 100 a 140kDa, de 140 a 170kDa o de 150 a 160kDa.

En una realización, el sacárido MenW, cuando está presente, tiene un peso molecular de 60 a 190kDa, de 70 a 180kDa, de 80 a 170kDa, de 90 a 160kDa, de 100 a 150kDa, de 110 a 140kDa, de 50 a 100kDa o de 120 a 140kDa.

El peso molecular o el peso molecular promedio de un sacárido se refiere en la presente memoria al peso molecular promedio en peso (Mw) del sacárido medido antes de la conjugación y se mide por MALLS.

La técnica MALLS es muy conocida en la técnica y se lleva a cabo típicamente como se describe en el ejemplo 2. Para el análisis MALLS de los sacáridos meningocócicos, se pueden utilizar dos columnas (TSKG6000 y 5000PWxl) en combinación y los sacáridos se eluyen en agua. Los sacáridos se detectan por medio de un detector de dispersión de luz (por ejemplo, el Wyatt Dawn DSP equipado con un láser de argón de 10mW a 488nm) y un refractómetro interferométrico (por ejemplo, el Wyatt Otilab DSP equipado con una célula P100 y un filtro rojo a 498nm).

En una realización los sacáridos de *N. meningitidis* son polisacáridos nativos o polisacáridos nativos que han reducido su tamaño durante un proceso de extracción normal.

En una realización, los sacáridos de *N. meningitidis* se clasifican por escisión mecánica, por ejemplo por microfluidización o sonicación. La microfluidización y la sonicación tienen la ventaja de disminuir el tamaño de los polisacáridos nativos más grandes lo suficiente como para proporcionar un conjugado filtrable (por ejemplo, a través de un filtro de 0,2 micrómetros). El dimensionamiento es por un factor no superior a x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, x2 o x1,5.

En una realización, la composición inmunogénica comprende conjugados de *N. meningitidis* que están hechos de una mezcla de polisacáridos nativos y sacáridos cuyo tamaño no es superior a x20. Por ejemplo, los sacáridos de MenC y/o MenA son nativos. Por ejemplo, los sacáridos de MenY y/o MenW tienen un tamaño no superior a x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3 o x2. Por ejemplo, una composición inmunogénica contiene un conjugado hecho de MenY y/o MenW y/o MenC y/o MenA que tiene un tamaño no superior a x10 y/o está microfluidizado. Por ejemplo, una composición inmunogénica contiene un conjugado hecho de MenA y/o MenC y/o MenW y/o MenY nativos. Por ejemplo, una composición inmunogénica comprende un conjugado hecho de MenC nativo. Por ejemplo, una composición inmunogénica comprende un conjugado hecho de MenC y MenA nativos cuyo tamaño no es superior a x10 y/o está microfluidificado. Por ejemplo, una composición inmunogénica comprende un conjugado hecho de MenC y MenY nativos cuyo tamaño no es superior a x10 y/o está microfluidificado.

En una realización, la polidispersidad del sacárido es de 1 a 1,5, de 1 a 1,3, de 1 a 1,2, de 1 a 1,1 o de 1 a 1,05 y tras la conjugación con una proteína portadora, la polidispersidad del conjugado es de 1,0 a 2,5, de 1,0 a 2,0, de 1,0 a 1,5, de 1,0 a 1,2, de 1,5 a 2,5, de 1,7 a 2,2 o de 1,5 a 2,0. Todas las mediciones de polidispersidad son por MALLS.

Los sacáridos tienen un tamaño opcional de hasta 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 veces el tamaño del polisacárido aislado de las bacterias.

En una realización, cada sacárido de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo o tiene un tamaño no superior a x10. En otra realización, cada sacárido capsular de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo. En otra realización, al menos

uno, dos, tres o cuatro sacáridos capsulares de *N. meningitidis* se clasifican por microfluidización. En otra realización, cada sacárido capsular de *N. meningitidis* tiene un tamaño no superior a x10. En otra realización, los conjugados de *N. meningitidis* están hechos de una mezcla de polisacáridos nativos y sacáridos cuyo tamaño no es superior a x10. En otra realización, el sacárido capsular del serogrupo Y tiene un tamaño no superior a x10. En otra realización, los sacáridos capsulares de los serogrupos A y C son polisacáridos nativos y los sacáridos de los serogrupos W135 e Y tienen un tamaño no superior a x10. En otra realización, el tamaño promedio de cada sacárido capsular de *N. meningitidis* está entre 50 kDa y 300 kDa o 50kDa y 200kDa. En otra realización, la composición inmunogénica comprende un sacárido capsular MenA que tiene un tamaño promedio superior a 50kDa, 75kDa, 100kDa o un tamaño promedio entre 50 y 100kDa o entre 55 y 90kDa o entre 60 y 80kDa. En otra realización, la composición inmunogénica comprende un sacárido capsular de MenC que tiene un tamaño promedio superior a 50kDa, 75kDa, 100kDa o entre 100 y 200kDa, entre 100 y 150kDa, entre 80 y 120kDa, entre 90 y 110kDa, entre 150 y 200kDa, entre 120 y 240kDa, entre 140 y 220kDa, entre 160 y 200kDa o entre 190 y 200kDa. En otra realización, la composición inmunogénica comprende un sacárido capsular MenY, que tiene un tamaño promedio superior a 50kDa, 75kDa, 100kDa o entre 60 y 190kDa o entre 70 y 180kDa o entre 80 y 170kDa o entre 90 y 160kDa o entre 100 y 150kDa, entre 110 y 145kDa o entre 120 y 140kDa. En otra realización, la composición inmunogénica comprende un sacárido capsular MenW que tiene un tamaño promedio superior a 50kDa, 75kDa, 100kDa o entre 60 y 190kDa o entre 70 y 180kDa o entre 80 y 170kDa o entre 90 y 160kDa o entre 100 y 150kDa, entre 140 y 180kDa, entre 150 y 170kDa o entre 110 y 140kDa.

La composición inmunogénica de la invención puede comprender un sacárido capsular de *H. influenzae* b (Hib) conjugado con una proteína portadora. Se puede conjugar con una proteína portadora seleccionada del grupo formado por TT, DT, CRM197, fragmento C de TT y proteína D, por ejemplo TT. El sacárido Hib se puede conjugar con la misma proteína portadora que para al menos uno, dos, tres o todos los conjugados de sacáridos capsulares de *N. meningitidis*, por ejemplo TT. La proporción entre el Hib y la proteína portadora en el conjugado de sacáridos capsulares del Hib puede estar entre 1:5 y 5:1 (p/p), por ejemplo entre 1:1 y 1:4, 1:2 y 1:3,5 o aproximadamente 1:3 (p/p). El sacárido capsular Hib se puede conjugar con la proteína portadora a través de un enlazador (véase más arriba). El enlazador puede ser bifuncional (con dos grupos amino reactivos, tales como el ADH, o dos grupos de ácido carboxílico reactivos, o un grupo amino reactivo en un extremo y un grupo de ácido carboxílico reactivo en el otro). Puede tener entre 4 y 12 átomos de carbono. El sacárido Hib se puede conjugar con la proteína portadora o el enlazador mediante el uso de CNBr o CDAP. La proteína portadora se puede conjugar con el sacárido Hib a través del enlazador por medio de un procedimiento que comprenda la química de la carbodiimida, por ejemplo la química EDAC (de este modo mediante el uso del grupo químico carboxilo del portador). La dosis del conjugado de sacáridos Hib puede estar entre 0,1 y 9µg, entre 1 y 5µg o entre 2 y 3µg de sacáridos.

En otra realización, la composición inmunogénica de la invención comprende un conjugado de sacáridos de Hib y al menos dos conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*, en los que el conjugado de Hib está presente en una dosis de sacáridos inferior a la dosis media de sacáridos de los al menos dos conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*. Alternativamente, el conjugado Hib está presente en una dosis de sacáridos menor que la dosis de sacáridos de cada uno de los al menos dos conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*. Por ejemplo, la dosis del conjugado Hib puede ser al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% inferior a la dosis media o más baja de sacáridos de los otros dos conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*.

La dosis media se determina por medio de la adición de las dosis de todos los sacáridos adicionales y la división por el número de sacáridos adicionales. Otros sacáridos son todos los sacáridos de la composición inmunogénica, aparte del Hib, y pueden incluir los sacáridos capsulares de *N. meningitidis*. La "dosis" se refiere a la cantidad de composición inmunogénica o vacuna que se administra a un ser humano.

Un sacárido Hib es el polisacárido capsular polirribosil fosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b o un oligosacárido derivado del mismo.

Por lo menos dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales se debe entender dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales además de un conjugado Hib. Los dos conjugados bacterianos adicionales pueden incluir conjugados de sacáridos capsulares de *N. meningitidis*.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender otros conjugados de sacáridos derivados de uno o más de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, Estreptococos del grupo A, Estreptococos del grupo B, *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*. En una realización, la composición inmunogénica comprende sacáridos capsulares derivados de uno o más de los serogrupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*. Otra realización comprende sacáridos capsulares derivados de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de sacáridos capsulares del neumococo se seleccionan opcionalmente entre los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (opcionalmente entre los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). Otra realización comprende los sacáridos capsulares de tipo 5, 8 o 336 de *Staphylococcus aureus*. Otra realización comprende los sacáridos capsulares tipo I, tipo II o tipo III de *Staphylococcus epidermidis*. Otra realización comprende el sacárido Vi de *S. typhi*. Otra realización comprende los sacáridos capsulares de tipo Ia, tipo Ic, tipo II, tipo III o tipo V del estreptococo del grupo B. Otra realización comprende los sacáridos capsulares del estreptococo del grupo A, que opcionalmente además comprenden al menos una proteína M y opcionalmente múltiples tipos de proteína M.

Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden comprender una vacuna DTPa o DTPw (por ejemplo, una que contenga DT, TT, y una vacuna contra la tos ferina de células enteras (Pw) o una vacuna contra la tos ferina acelular (Pa) (que comprenda, por ejemplo, toxoide de tos ferina, FHA, pertactina y, opcionalmente, aglutinoginas 2 y 3). Dichas combinaciones también pueden comprender una vacuna contra la hepatitis B (por ejemplo, puede comprender el antígeno de superficie de la hepatitis B [HepB], opcionalmente adsorbido en fosfato de aluminio). En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende una vacuna DTPwHepBHibMenAC en la que el componente HibMenAC es el descrito anteriormente.

Las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden opcionalmente antígenos virales adicionales que confieren protección contra la enfermedad causada por el sarampión y/o las paperas y/o la rubéola y/o la varicela. Por ejemplo, la composición inmunogénica de la invención contiene antígenos de sarampión, paperas y rubéola (MMR) o sarampión, paperas, rubéola y varicela (MMRV). En una realización, estos antígenos virales están opcionalmente presentes en el mismo recipiente que los conjugados de sacáridos de meningococo y/o Hib. En una realización, estos antígenos virales son liofilizados.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende además un antígeno de *N. meningitidis* del serogrupo B. El antígeno es opcionalmente un polisacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo B (MenB) o un polisacárido u oligosacárido derivado del mismo, que puede estar conjugado con un portador proteico. El antígeno es opcionalmente una preparación de vesícula de membrana externa de *N. meningitidis* serogrupo B como se describe en los documentos EP301992, WO 01/09350, WO 04/14417, WO 04/14418 y WO 04/14419.

En general, la composición inmunogénica de la invención puede comprender una dosis de cada conjugado de sacárido entre 0,1 y 20 μ g, 2 y 10 μ g, 2 y 6 μ g o 4 y 7 μ g de sacárido.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención contiene cada sacárido capsular de *N. meningitidis* en una dosis de entre 0,1 y 20 μ g; entre 1 y 10 μ g; entre 2 y 10 μ g, entre 2,5 y 5 μ g, aproximadamente o exactamente 5 μ g; o aproximadamente o exactamente 2,5 μ g. En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende MenA, MenC, MenW y MenY (opcionalmente conjugados con toxoide tetánico) en dosis de 2,5, 2,5, 2,5 y 2,5 μ g respectivamente, 5, 5, 5 y 5 μ g respectivamente o 5, 5, 2,5 y 2,5 μ g respectivamente.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención, por ejemplo, contiene el conjugado de sacáridos Hib en una dosis de sacáridos entre 0,1 y 9 μ g; 1 y 5 μ g o 2 y 3 μ g o aproximadamente o exactamente 2,5 μ g. En otra realización, la composición inmunogénica de la invención contiene, por ejemplo, el conjugado de sacáridos de Hib en una dosis de sacáridos entre 0,1 y 9 μ g; 1 y 5 μ g o 2 y 3 μ g o aproximadamente o exactamente 2,5 μ g y cada uno de los conjugados de polisacáridos de *N. meningitidis* en una dosis de sacáridos entre 2 y 20 μ g, 3 y 10 μ g, o entre 4 y 7 μ g o aproximadamente o exactamente 5 μ g.

Los términos “alrededor de” o “aproximadamente” se definen como dentro del 10% más o menos de la cifra dada a efectos de la invención.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención puede contener una dosis de sacáridos del conjugado de sacáridos de Hib que es, por ejemplo, inferior al 90%, 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% o 10% de la dosis media de sacáridos de al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*. La dosis de sacáridos del sacárido Hib está, por ejemplo, entre el 20% y el 60%, el 30% y el 60%, el 40% y el 60% o aproximadamente o exactamente el 50% de la dosis media de sacáridos de al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención contiene una dosis de sacáridos del conjugado de sacáridos de Hib que es, por ejemplo, inferior al 90%, 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% o 10% de la dosis de sacáridos más baja de al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*. La dosis de sacáridos del sacárido Hib está, por ejemplo, entre el 20% y el 60%, el 30% y el 60%, el 40% y el 60% o aproximadamente o exactamente el 50% de la dosis de sacáridos más baja de los al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*.

En una realización de la invención, la dosis de sacáridos de cada uno de los al menos dos, tres, cuatro o cada uno de los conjugados de sacáridos de *N. meningitidis* es opcionalmente la misma, o aproximadamente la misma.

Los ejemplos de composiciones inmunogénicas de la divulgación son composiciones que consisten o comprenden:

Conjugado Hib y conjugado MenA y conjugado MenC, opcionalmente en proporciones de sacáridos de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacáridos de MenA es mayor que la dosis de sacáridos de MenC.

Conjugado Hib y conjugado MenC y conjugado MenY, opcionalmente en proporciones de sacáridos de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacáridos de MenC es mayor que la dosis de sacáridos de MenY.

Conjugado Hib y conjugado MenC y conjugado MenW, opcionalmente en proporciones de sacáridos de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacáridos de MenC es mayor que la dosis de sacáridos de MenW.

Conjugado Hib y conjugado MenA y conjugado MenW, opcionalmente en proporciones de sacáridos de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacáridos de MenA es mayor que la dosis de sacáridos de MenW.

5 Conjugado Hib y conjugado MenA y conjugado MenY, opcionalmente en proporciones de sacáridos de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacáridos de MenA es mayor que la dosis de sacáridos de MenY.

Conjugado Hib y conjugado MenW y conjugado MenY, opcionalmente en proporciones de sacáridos de 1:2:2, 1:2:1, 1:1:2, 1:4:2, 1:2:4, 1:4:1, 1:1:4, 1:3:6, 1:1:3, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (p/p). Opcionalmente, la dosis de sacáridos de MenY es mayor que la dosis de sacáridos de MenW.

10 MenA, MenC, MenW y MenY en proporciones de sacáridos de 1:1:1:1 o 2:1:1:1 o 1:2:1:1 o 2:2:1:1 o 1:3:1:1 o 1:4:1:1 (p/p).

Otro aspecto de la invención es una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención y un excipiente aceptable para uso farmacéutico.

15 En una realización, la composición inmunogénica de la invención está ajustada o tamponada a, o ajustada a entre pH 7,0 y 8,0, pH 7,2 y 7,6 o aproximadamente o exactamente pH 7,4.

La composición inmunogénica o las vacunas de la invención se liofilizan opcionalmente en presencia de un agente estabilizador, por ejemplo, un poliol tal como la sacarosa o la trehalosa. Opcionalmente, la composición inmunogénica o vacuna de la invención contiene una cantidad de un adyuvante suficiente para potenciar la respuesta inmunitaria al inmunógeno. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), mezclas de escualeno (SAF-1), péptido muramil, derivados de saponina, preparaciones de la pared celular de micobacterias, lípido monofosforil A, derivados del ácido micólico, tensioactivos de copolímero en bloque no iónico, Quil A, subunidad de la toxina del cólera B, polifosfazeno y derivados, y complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) tales como los descritos por Takahashi *et al.* (1990) *Nature* 344:873 a 875.

25 Para las combinaciones de *N. meningitidis* o HibMen discutidas anteriormente, puede ser ventajoso no utilizar ningún adyuvante de sal de aluminio o ningún adyuvante.

Como con todas las composiciones o vacunas inmunogénicas, las cantidades inmunológicamente eficaces de los inmunógenos se deben determinar empíricamente. Entre los factores que se deben tener en cuenta están la inmunogenicidad, si el inmunógeno estará o no complejado o unido covalentemente a un adyuvante o proteína portadora u otro portador, la vía de administración y el número de dosis inmunizantes que se administrarán.

30 El agente activo puede estar presente en concentraciones variables en la composición farmacéutica o vacuna de la invención. Normalmente, la concentración mínima de la sustancia es la cantidad necesaria para lograr su uso previsto, mientras que la concentración máxima es la cantidad máxima que permanecerá en solución o suspendida homogéneamente dentro de la mezcla inicial. Por ejemplo, la cantidad mínima de un agente terapéutico es, opcionalmente, aquella que proporcionará una única dosis terapéuticamente eficaz. En el caso de las sustancias bioactivas, la concentración mínima es la cantidad necesaria para la bioactividad en el momento de la reconstitución y la concentración máxima es el punto en el que no se puede mantener una suspensión homogénea. En el caso de las unidades monodosis, la cantidad es la de una sola aplicación terapéutica. En general, se espera que cada dosis comprenda de 1 a 100µg de antígeno proteico, opcionalmente de 5 a 50µg o de 5 a 25µg. Por ejemplo, las dosis de sacáridos bacterianos son de 10 a 20µg, 5 a 10µg, 2,5 a 5µg o 1 a 2,5µg de sacárido en el conjugado.

40 Las preparaciones vacunales de la presente invención se pueden utilizar para proteger o tratar a un mamífero (por ejemplo, un paciente humano) susceptible de infección, por medio de la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosa. Un paciente humano es opcionalmente un lactante (menos de 12 meses), un niño pequeño (12 a 24, 12 a 16 o 12 a 14 meses), un niño (2 a 10, 3 a 8 o 3 a 5 años) un adolescente (12 a 21, 14 a 20 o 15 a 19 años) o un adulto. Estas administraciones pueden incluir la inyección por *vía* intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o la administración por *vía* mucosa en los tractos oral/alimentario, respiratorio y genitourinario. Se prefiere la administración intranasal de las vacunas para el tratamiento de la neumonía o la otitis media (dado que se puede prevenir más eficazmente el transporte nasofaríngeo de los neumococos, para de ese modo atenuar la infección en su fase más temprana). Aunque la vacuna de la invención se puede administrar como una dosis única, los componentes de la misma también se pueden coadministrar juntos al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, si los sacáridos están presentes en una vacuna, éstos se podrían administrar por separado al mismo tiempo o 1 a 2 semanas después de la administración de una vacuna de proteínas bacterianas para una coordinación óptima de las respuestas inmunitarias entre sí). Además de una única vía de administración, se pueden utilizar 2 vías de administración diferentes. Por ejemplo, los antígenos virales se pueden administrar por vía ID (intradérmica), mientras que las proteínas bacterianas se pueden administrar por vía IM (intramuscular) o IN (intranasal). Si hay sacáridos, se pueden administrar IM (o ID) y las proteínas bacterianas se pueden administrar IN (o ID). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar por vía IM para las dosis de preparación y por vía IN para las dosis de refuerzo.

La preparación de la vacuna se describe generalmente en *Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach"* (eds. Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación dentro de liposomas está descrita por Fullerton, Patente de los Estados Unidos 4.235.877.

Otro aspecto de la invención es un kit de vacunas para la administración concomitante o secuencial que comprende dos composiciones inmunogénicas multivalentes para conferir protección en un huésped contra la enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Neisseria meningitidis* y opcionalmente *Haemophilus influenzae*. Por ejemplo, el kit opcionalmente comprende un primer recipiente que comprende uno o más de:

5
 toxoide tetánico (TT),
 toxoide diftérico (DT), y
 componentes de células enteras o de tos ferina acelular

10 y un segundo recipiente que comprende: una composición inmunogénica de la invención como la descrita anteriormente (por ejemplo, las que comprenden combinaciones de sacáridos Men o HibMen).

Otro aspecto de la invención es un kit de vacunas para la administración concomitante o secuencial que comprende dos composiciones inmunogénicas multivalentes para conferir protección en un huésped contra la enfermedad causada por *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* y opcionalmente *Haemophilus influenzae*. Por ejemplo, el kit opcionalmente comprende un primer recipiente que comprende:

15 uno o más conjugados de una proteína portadora y un sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* [donde el sacárido capsular opcionalmente es de un serotipo neumocócico seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F].

y un segundo recipiente que comprende:

20 una composición inmunogénica de la invención como la descrita anteriormente (por ejemplo, las que comprenden combinaciones de sacáridos Men o HibMen).

Los ejemplos del conjugado Hib y de los conjugados de polisacáridos de *N. meningitidis* son los descritos anteriormente.

Típicamente, la vacuna contra *Streptococcus pneumoniae* en el kit de vacunas de la presente invención (o en cualquiera de las composiciones inmunogénicas de la invención descritas anteriormente) comprenderá antígenos sacáridos (opcionalmente conjugados), en el que los sacáridos se derivan de al menos cuatro serotipos de neumococo elegidos del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Opcionalmente, los cuatro serotipos incluyen 6B, 14, 19F y 23F. Opcionalmente, se incluyen en la composición al menos 7 serotipos, por ejemplo los derivados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Opcionalmente se incluyen más de 7 serotipos en la composición, por ejemplo, al menos 10, 11, 12, 13 o 14 serotipos. Por ejemplo, la composición en una realización incluye 10 u 11 sacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, y opcionalmente 3 (todos opcionalmente conjugados). En una realización de la invención se incluyen al menos 13 antígenos sacáridos (opcionalmente conjugados), aunque también se contemplan en la invención otros antígenos sacáridos, por ejemplo 23 valentes (tales como los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F).

Los sacáridos neumocócicos se conjugan independientemente con cualquier proteína portadora conocida, por ejemplo CRM197, toxoide tetánico, toxoide diftérico, proteína D o cualquier otra proteína portadora mencionada anteriormente.

Opcionalmente, los kits de vacunas de la invención comprenden un tercer componente. Por ejemplo, el kit opcionalmente comprende un primer recipiente que comprende uno o más de:

40 toxoide tetánico (TT),
 toxoide diftérico (DT), y
 componentes de células enteras o de tos ferina acelular
 y un segundo recipiente que comprende :

45 uno o más conjugados de una proteína portadora y un sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* [donde el sacárido capsular opcionalmente es de un serotipo neumocócico seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F].

y un tercer recipiente que comprende:

una composición inmunogénica de la invención como la descrita anteriormente (por ejemplo, las que comprenden combinaciones de sacáridos Men o HibMen).

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de fabricación de la composición inmunogénica o la vacuna de la divulgación, que comprende la etapa de mezclar los sacáridos de la invención, por ejemplo mezclar sacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o los cuatro serogrupos A, C, W e Y conjugados con una proteína portadora con un excipiente aceptable para uso farmacéutico.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de inmunización de un huésped humano contra la enfermedad causada por bacterias, por ejemplo la infección por *N. meningitidis* y, opcionalmente, por *Haemophilus influenzae*, que comprende la administración al huésped de una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o la vacuna

o el kit de la invención, opcionalmente mediante el uso de una dosis única.

Un aspecto independiente de la divulgación es un procedimiento para inmunizar a un huésped humano con una composición inmunogénica que comprende al menos 2 conjugados de sacáridos capsulares de *N. meningitidis* seleccionados del grupo que consiste en los serogrupos A, C, W e Y (opcionalmente MenA, C, W e Y) en el que una administración de una dosis única (opcionalmente a adolescentes, adultos o niños) da como resultado un análisis de sangre llevado a cabo un mes después de la administración que da más del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de respondedores en un ensayo SBA que mide los niveles de respuesta contra MenA, MenC, MenW y/o MenY. Opcionalmente, el ensayo SBA es como el descrito en el Ejemplo 9 con la evaluación de la respuesta como se describe en el Ejemplo 9.

10 Otro aspecto independiente de la divulgación es una composición inmunogénica que comprende conjugados MenA, MenC, MenW y/o MenY que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria tras una única dosis tal que más del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de los sujetos humanos (niños, adolescentes o adultos) inoculados se clasifican como respondedores en un ensayo SBA en sangre extraída un mes después de la inoculación (opcionalmente mediante el uso de los criterios descritos en el ejemplo 9).

15 Dicha composición inmunogénica opcionalmente tiene las características estructurales adicionales descritas en la presente memoria.

Otro aspecto de la invención es una composición inmunogénica de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por bacterias, por ejemplo la infección por *N. meningitidis* y opcionalmente por *Haemophilus influenzae*.

20 Otro aspecto de la invención es el uso de la composición inmunogénica o la vacuna o el kit de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por bacterias, por ejemplo, *N. meningitidis* y opcionalmente la infección por *Haemophilus influenzae*.

Los inventores pretenden que los términos “que comprende”, “comprenden” y “comprende” sean opcionalmente sustituibles por los términos “que consiste en”, “consisten en” y “consiste en”, respectivamente, en todos los casos.

25 La invención se ilustra en los ejemplos adjuntos. Los ejemplos que se presentan a continuación se llevan a cabo por medio de técnicas estándar, que son muy conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, salvo que se describa en detalle lo contrario. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - preparación de conjugados de polisacáridos

30 La unión covalente del polisacárido PRP de *Haemophilus influenzae* (Hib) al TT se llevó a cabo por medio de una química de acoplamiento desarrollada por Chu *et al.* (*Infection and Immunity* 1983, 40 (1); 245 a 256). El polisacárido Hib PRP se activó por medio de la adición de CNBr y la incubación a un pH de 10,5 durante 6 minutos. El pH se redujo a un pH de 8,75 y se añadió dihidrazida de ácido adípico (ADH) y se continuó la incubación durante otros 90 minutos. La PRP activada se acopló al toxoide tetánico purificado por medio de la condensación de carbodiimida mediante el uso de 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida (EDAC). Se añadió EDAC a la PRP activada para alcanzar una proporción final de 0,6 mg de EDAC/mg de PRP activada. El pH se ajustó a 5,0 y se añadió toxoide tetánico purificado para alcanzar 2 mg de TT/mg de PRP activado. La solución resultante se dejó durante tres días con agitación suave. Tras la filtración a través de una membrana de 0,45 µm, el conjugado se purificó en una columna sephacryl S500HR (Farmacia, Suecia) equilibrada en NaCl 0,2M.

40 Los conjugados MenC -TT se produjeron mediante el uso de polisacáridos nativos (de más de 150kDa de acuerdo con la medición de MALLS) o se microfluidificaron ligeramente. Los conjugados MenA-TT se produjeron mediante el uso del polisacárido nativo o el polisacárido ligeramente microfluidificado de más de 60kDa de acuerdo con el procedimiento MALLS del ejemplo 2. Los conjugados MenW y MenY-TT se produjeron mediante el uso de polisacáridos de un tamaño aproximado de 100 a 200kDa, medido por MALLS (véase el ejemplo 2). El dimensionamiento se llevó a cabo por microfluidización mediante el uso de un aparato homogeneizador Emulsiflex C-50. A continuación, los polisacáridos se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

La activación y el acoplamiento se llevaron a cabo como se describe en los Documentos WO96/29094 y WO 00/56360. Brevemente, el polisacárido a una concentración de 10 a 20mg/ml en NaCl 2M pH 5,5 a 6,0 se mezcló con la solución CDAP (100mg/ml recién preparada en acetonitrilo/WFI, 50/50) hasta alcanzar una proporción final CDAP/polisacárido de 0,75/1 o 1,5/1. Después de 1,5 minutos, se elevó el pH con hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH de 10,0. Después de tres minutos se añadió toxoide tetánico para alcanzar una proporción de proteína/polisacárido de 1,5/1 para MenW, 1,2/1 para MenY, 1,5/1 para MenA o 1,5/1 para MenC. La reacción continuó durante una o dos horas.

Después de la etapa de acoplamiento, se añadió glicina hasta una proporción final de glicina/PS (p/p) de 7,5/1 y se ajustó el pH a un pH de 9,0. La mezcla se dejó durante 30 minutos. El conjugado se clarificó mediante el uso de un filtro Kleenpak de 10µm y luego se cargó en una columna Sephacryl S400HR mediante el uso de un tampón de elución

de 150mM NaCl, 10mM o 5mM Tris a un pH de 7,5. Los lotes clínicos se filtraron en una membrana de esterilización Opticap 4. Los conjugados resultantes tenían una proporción media de polisacáridos:proteínas de 1:1 a 1:5 (p/p).

Ejemplo 1a - preparación de los conjugados de polisacáridos MenA y MenC de la invención

- 5 Los conjugados MenC -TT se produjeron mediante el uso de polisacáridos nativos (de más de 150kDa medidos por MALLS) o se microfluidizaron ligeramente. Los conjugados MenA-TT se produjeron mediante el uso del polisacárido nativo o el polisacárido ligeramente microfluidificado de más de 60kDa de acuerdo con el procedimiento MALLS del ejemplo 2. El dimensionamiento se llevó a cabo por microfluidización mediante el uso de un aparato homogeneizador Emulsiflex C-50. A continuación, los polisacáridos se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.
- 10 A fin de conjugar el polisacárido capsular MenA con el toxoide tetánico a través de un espaciador, se utilizó el siguiente procedimiento. La unión covalente del polisacárido y el espaciador (HAD) se lleva a cabo por medio de una química de acoplamiento por la que el polisacárido es activado en condiciones controladas por un agente cianilante, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP). El espaciador reacciona con el PS cianilado a través de sus grupos hidrazinos, para formar un enlace de isourea estable entre el espaciador y el polisacárido.
- 15 Se trató una solución de 10mg/ml de MenA (pH 6,0) [3,5 g] con una solución recién preparada de 100mg/ml de CDAP en acetonitrilo/agua (50/50 (v/v)) para obtener una proporción de CDAP/MenA de 0,75 (p/p). Después de 1,5 minutos, el pH se elevó a un pH de 10,0. Tres minutos después, se añadió ADH para obtener una proporción de ADH/MenA de 8,9. El pH de la solución se redujo a 8,75 y la reacción prosiguió durante 2 horas manteniendo este pH (con la temperatura mantenida a 25 °C).
- 20 La solución de PSAAH se concentró hasta un cuarto de su volumen inicial y luego se diafiltró con 30 volúmenes de NaCl 0,2M mediante el uso de una membrana Filtron Omega con un corte de 10kDa, y se filtró el retentado.
- Antes de la reacción de conjugación (condensación de carbodiimida), la solución de TT purificada y la solución de PSAAH se diluyeron para alcanzar una concentración de 10 mg/ml para el PSAAH y 10mg/ml para el TT.
- 25 Se añadió EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida) a la solución de PSAH (2g de sacárido) a fin de alcanzar una proporción final de 0,9 mg de EDAC/mg de PSAAH. El pH se ajustó a 5,0. El toxoide tetánico purificado se añadió con una bomba peristáltica (en 60 minutos) para alcanzar 2 mg de TT/mg PSAAH. La solución resultante se dejó 60 minutos a +25 °C bajo agitación para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 min. La solución se neutralizó por medio de la adición de Tris-HCl 1M de pH 7,5 (1/10 del volumen final) y se dejó 30 minutos a +25 °C y luego toda la noche a +2 °C a +8 °C.
- 30 El conjugado se clarificó con un filtro de 10 µm y se purificó con una columna Sephacryl S400HR (Pharmacia, Suecia). La columna se equilibró en 10 mM Tris-HCl (pH 7,0), 0,075 M NaCl y se cargó el conjugado (aprox. 660mL) en la columna (+2 °C a +8 °C). La reunión de elución se seleccionó en función de la densidad óptica a 280 nm. La recolección comenzó cuando la absorbencia aumentó a 0,05. La cosecha continuó hasta que el Kd alcanzó 0,30. El conjugado se esterilizó por filtro a +20 °C, y luego se almacenó entre +2 °C y +8 °C. El conjugado resultante tenía una proporción de polisacárido:proteína de 1:2 a 1:4 (p/p).
- 35 A fin de conjugar el polisacárido capsular MenC con el toxoide tetánico a través de un espaciador, se utilizó el siguiente procedimiento. La unión covalente del polisacárido y el espaciador (HAD) se lleva a cabo por medio de una química de acoplamiento por la que el polisacárido es activado en condiciones controladas por un agente cianilante, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP). El espaciador reacciona con el PS cianilado a través de sus grupos hidrazinos, para formar un enlace de isourea estable entre el espaciador y el polisacárido.
- 40 Se trató una solución de 20mg/ml de MenC (pH 6,0) (3,5 g) con una solución de 100mg/ml de CDAP recién preparada en acetonitrilo/agua (50/50 (v/v)) para obtener una proporción de CDAP/MenC de 1,5 (p/p). Después de 1,5 minutos, el pH se elevó a un pH de 10,0. En el momento de la activación se añadió NaCl 5M para alcanzar una concentración final de NaCl 2M. Tres minutos después, se añadió ADH para obtener una proporción de ADH/MenC de 8,9. El pH de la solución se redujo a 8,75 y la reacción prosiguió durante 2 horas (retenida a 25 °C).
- 45 La solución de PSCAH se concentró hasta un mínimo de 150 mL y luego se diafiltró con 30 volúmenes de NaCl 0,2M mediante el uso de una membrana Filtron Omega con un corte de 10kDa, y se filtró el retentado.
- Antes de la reacción de conjugación, la solución de TT purificada y la solución de PSCAH (escala de 2g) se diluyeron en NaCl 0,2M para alcanzar una concentración de 15 mg/ml para PSCAH y 20mg/ml para TT.
- 50 El toxoide tetánico purificado se añadió a la solución de PSCAH a fin de alcanzar 2 mg de TT/mg de PSCAH. El pH se ajustó a 5,0. Se añadió EDAC (16,7 mg/ml en Tris 0,1M pH 7,5) con una bomba peristáltica (en 10 minutos) para alcanzar una proporción final de 0,5 mg de EDAC/mg de PSCAH. La solución resultante se dejó 110 min a +25 °C bajo agitación y regulación del pH para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 min. A continuación, la solución se neutralizó por medio de la adición de Tris-HCl 1M de pH 9,0 (1/10 del volumen final) y se dejó 30 minutos a +25 °C y luego toda la noche a +2 °C a +8 °C.

El conjugado se clarificó con un filtro de 10 µm y se purificó con una columna Sephacryl S400HR (Farmacia, Suecia). La columna se equilibró en 10 mM de Tris-HCl (pH 7,0), 0,075 M de NaCl y se cargó el conjugado (aprox. 460mL) en la columna (+2 °C a +8 °C). La reunión de elución se seleccionó en función de la densidad óptica a 280 nm. La recolección comenzó cuando la absorbencia aumentó a 0,05. La cosecha continuó hasta que el Kd alcanzó 0,20. El conjugado se esterilizó por filtro a +20 °C, y luego se almacenó entre +2 °C y +8 °C. El conjugado resultante tenía una proporción polisacárido:proteína de 1:2 a 1:4 (p/p).

Ejemplo 2 - Determinación del peso molecular por medio de MALLS

Los detectores se acoplaron a una columna de exclusión por tamaño de HPLC de la que se eluyeron las muestras. Por un lado, el detector de dispersión de luz láser midió las intensidades de luz dispersadas en 16 ángulos por la solución macromolecular y, por otro lado, un refractómetro interferométrico colocado en línea permitió determinar la cantidad de muestra eluida. A partir de estas intensidades, se puede determinar el tamaño y la forma de las macromoléculas en solución.

El peso molecular promedio en peso (M_w) se define como la suma de los pesos de todas las especies multiplicada por su peso molecular respectivo y dividida por la suma de los pesos de todas las especies.

15 a) Peso molecular promedio en peso: - M_w -

$$M_w = \frac{\sum W_i \cdot M_i}{\sum W_i} = \frac{m_2}{m_1}$$

b) Peso molecular promedio en número: - M_n -

$$M_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} = \frac{m_1}{m_0}$$

c) Radio cuadrático medio: - R_w - y R^2_w es el radio cuadrado definido por:

$$R^2_w \text{ o } (r^2)_w = \frac{\sum m_i \cdot r_i^2}{\sum m_i}$$

20 (- m_i - es la masa de un centro de dispersión i y - r_i - es la distancia entre el centro de dispersión i y el centro de gravedad de la macromolécula).

d) La polidispersidad se define como la proporción de - M_w / M_n -.

25 Los polisacáridos meningocócicos fueron analizados por MALLS por medio de la carga en dos columnas HPLC (TSKG6000 y 5000PWxl) utilizadas en combinación. Se cargaron 25µl del polisacárido en la columna y se eluyeron con 0,75ml de agua filtrada. Los poliácidos se detectan por medio de un detector de dispersión de luz (Wyatt Dawn DSP equipado con un láser de argón de 10mW a 488nm) y un refractómetro inferométrico (Wyatt Otilab DSP equipado con una célula P100 y un filtro rojo a 498nm).

30 Las polidispersidades de peso molecular y las recuperaciones de todas las muestras se calcularon por el procedimiento de Debye mediante el uso de un ajuste polinómico de orden 1 en el software Astra 4.72.

Ejemplo 3 - ensayo clínico que compara la inmunización con Meningitec o con un conjugado MenC-TT de mayor tamaño

35 Se llevó a cabo un estudio de fase II, abierto y controlado, para comparar la vacuna conjugada contra el meningococo del serogrupo C (MenC) de GSK Biological con la vacuna conjugada contra el *Haemophilus influenzae* b-meningococo del serogrupo C (Hib-MenC) o Meningitec®. Cada dosis de Meningitec® contiene 10µg de oligosacárido meningocócico del serogrupo C conjugado con 15µg de CRM197 y es producido por Wyeth. Los conjugados MenC de GSK contenían polisacáridos nativos de unos 200kDa conjugados con toxoide tetánico (TT).

40 El estudio consistió en cinco grupos, cada uno de los cuales estaba previsto que contuviera 100 sujetos, asignados a dos brazos paralelos de la siguiente manera: En el presente estudio, todos los sujetos de ambos brazos recibieron un quinto (1/5) de una dosis de Mencevax™ ACWY y una dosis concomitante de Infanrix™ hexa a los 12 a 15 meses de edad (mes 0 del estudio). Se tomaron dos muestras de sangre de todos los sujetos (mes 0 y mes 1 del estudio). El brazo 1 consistió en cuatro grupos de un estudio de vacunación primaria que fueron cebados a los 3, 4 y 5 meses de edad con las siguientes vacunas:

- 45 • Grupo K: MenC (10 µg), sin adsorción (sin ads), toxoide tetánico (TT) conjugado e Infanrix™ hexa (MenC10-TT + Infanrix™ hexa)

- Grupo L: Hib (10 µg)-MenC (10 µg), conjugado TT sin ads y Infanrix™ penta (Hib10-MenC10-TT + Infanrix™ penta)
- Grupo M: Hib (5 µg)-MenC (5 µg), sin ads, conjugado TT e Infanrix™ penta (Hib5-MenC5-TT + Infanrix™ penta)
- Grupo N: Meningitec™ e Infanrix™ hexa (Meningitec™ + Infanrix™ hexa)

5 Los dos grupos de la vacuna Hib-MenC-TT (Grupos L y M) se mantuvieron ciegos en el estudio de refuerzo en cuanto a la formulación exacta de la vacuna candidata.

El brazo 2 (grupo O) estaba formado por sujetos de la misma edad que no habían sido vacunados previamente con una vacuna contra el meningococo del serogrupo C (ingenuos), pero que habían recibido vacunas pediátricas de rutina de acuerdo con la Comisión Permanente de Inmunización de Alemania.

Criterios de evaluación:

10 **Inmunogenicidad:** Determinación de los títulos de anticuerpos bactericidas contra el meningococo C (SBA-MenC) por medio de una prueba bactericida (punto de corte: una dilución de 1:8) y medición por ELISA de los anticuerpos contra el serogrupo C del meningococo (punto de corte del ensayo: 0,3 µg/ml), el polisacárido Hib PRP (punto de corte del ensayo: 0,15 µg/ml) y toxoide tetánico (punto de corte del ensayo: 0,1 UI/ml) en muestras de sangre obtenidas antes de la vacunación y aproximadamente un mes después de la misma en todos los sujetos.

15 **Procedimientos estadísticos:**

Datos demográficos: Determinación de la edad media en meses (con la mediana, el intervalo y la desviación estándar [DE]), y la composición racial y de género de las cohortes de vacunación ATP y Total.

Inmunogenicidad:

20 Se llevaron a cabo dos análisis de inmunogenicidad basados en la cohorte ATP para la inmunogenicidad (para los análisis de la memoria inmunitaria y la respuesta de refuerzo) o la cohorte ATP para la seguridad (para el análisis de la persistencia). Entre ellas se encuentran: *Evaluación de la memoria inmunitaria para MenC y de la respuesta de refuerzo para Hib y Tétanos* (antes y un mes después de la administración de 1/5 dosis de la vacuna polisacárida simple):

- Determinación de la media geométrica de títulos y concentraciones (GMT y GMC) con intervalos de confianza del 95% (95% de IC)
- Determinación del porcentaje de sujetos con título/concentración de anticuerpos por encima de los puntos de corte propuestos con un IC exacto del 95% (tasas de seropositividad/seroprotección)
- Investigación de los títulos/concentración de anticuerpos tras la vacunación por medio de curvas acumulativas inversas
- Cálculo del 95% de IC asintótico estandarizado para la diferencia en la tasa de seropositividad/seroprotección entre el grupo cebado (grupos K, L, M y N) y el grupo no cebado (grupo O)
- Determinación de la media geométrica de la proporción individual del título de SBA-MenC sobre la concentración de anti-PSC, con un IC del 95%
- Determinación del IC del 95% para la proporción de GMT/C después de la vacunación entre los grupos K, L, M y el grupo de control N para anti-PRP y anti-tétanos y entre cada grupo cebado (Grupos K, L, M y N) y el grupo no cebado (Grupo O) para SBA-MenC y anti-PSC mediante el uso de un modelo ANOVA

Resultados

Tabla 1. Títulos de SBA-MenC y concentración de anticuerpos anti-PSC tras la vacunación de refuerzo

Anticuerpo	Grupo	N	GMT/C	95% de CL LI	95% de CL LS
SBA-MenC	K -MenC-TT	71	3508,9	2580,1	4772,2
	L - HibMenC	79	2530,1	1831,7	3494,7
	M-HibMenC	81	5385,4	4425,0	6554,2
	N -Meningitec	85	1552,6	1044,4	2307,9
	O - Control	91	9,3	6,3	13,6
Anti-PSC	K -MenC-TT	70	28,10	22,59	34,95

Anticuerpo	Grupo	N	GMT/C	95% de CL LI	95% de CL LS
	L - HibMenC	71	30,01	24,09	37,38
	M-HibMenC	76	34,58	29,10	41,09
	N -Meningitec	78	16,59	12,98	21,21
	O - Control	94	3,05	2,36	3,93

5 Grupo K: sujetos cebados con MenC10-TT + Infanrix. hexa; Grupo L: sujetos cebados con Hib10-MenC10-TT + Infanrix. penta; Grupo M: sujetos cebados con Hib5-MenC5-TT + Infanrix. penta; Grupo N: sujetos cebados con Meningitec. + Infanrix. hexa; Grupo O: sujetos de control (es decir, sujetos no cebados con la vacuna conjugada MenC) N: número de sujetos con resultados disponibles.

Se consiguieron títulos más altos de anticuerpos contra MenC y títulos más altos de SBA al cebar con las vacunas conjugadas de polisacáridos MenC de mayor tamaño (grupos K, L y M) en comparación con la vacuna conjugada de oligosacáridos Meningitec.

Tabla 2: Proporción media geométrica entre el título de MenC de la SBA y la concentración de anti-PSC

Grupo	Cronometraje	N	GMR	LI	LS
K	Pre	70	49,470	34,939	70,044
	Post	66	126,138	101,419	156,882
L	Pre	76	36,528	25,849	51,621
	Post	70	90,200	70,153	115,975
M	Pre	77	51,298	36,478	72,139
	Post	74	164,950	139,304	195,318
N	Pre	84	22,571	16,521	30,837
	Post	76	90,168	67,757	119,991
O	Pre	3	91,634	0,651	12889,8
	Post	87	2,708	1,767	4,149

10

En los cuatro grupos cebados (Grupos K, L, M y N), la GMR aumentó significativamente desde antes hasta después de la vacunación de refuerzo, lo cual indica la presencia de maduración y funcionalidad de los anticuerpos. La GMR en el Grupo M (cebado con Hib5-MenC5-TT) fue mayor que en el Grupo N (cebado con Meningitec™).

Tabla 3: Persistencia a los 12 a 15 meses de edad justo antes de la administración de las vacunas de refuerzo

Puntos finales	Grupo	N	%	Grupo	N	%	Diferencia	% de Valor
SBA-MenC ≥ 1:8	K	79	88,6	N	91	80,2	N-K	-8,4
	L	84	93,3	N	91	80,2	N-L	-3,1
	M	85	87,1	N	91	80,2	N-M	-6,8

Puntos finales	Grupo	N	%	Grupo	N	%	Diferencia	% de Valor
SBA-MenC ≥ 1:128	K	79	65,8	N	91	51,6	N-K	-14,2
	L	84	56,0	N	91	51,6	N-L	-4,3
	M	85	64,7	N	91	51,6	N-M	-13,1
Anti-PSC ≥0,3µg/ml	K	79	100,0	N	91	100,0	N-K	0,0
	L	84	100,0	N	91	100,0	N-L	0,0
	M	88	98,9	N	91	100,0	N-M	1,1
Anti-PSC ≥2µg/ml	K	79	72,2	N	91	81,3	N-K	9,2
	L	84	64,3	N	91	81,3	N-L	17,0
	M	88	64,3	N	91	81,3	N-M	8,6
Anti-PRP ≥0,15µg/ml	K	81	88,9	N	91	85,7	N-K	-3,2
	L	86	96,5	N	91	85,7	N-L	-10,8
	M	90	98,9	N	91	85,7	N-M	-13,2
Anti-PRP ≥1µg/ml	K	81	33,3	N	91	28,6	N-K	-4,8
	L	86	55,8	N	91	28,6	N-L	-27,2
	M	90	74,4	N	91	28,6	N-M	-45,9
Anti-tetánica ≥0,1 UI/ml	K	81	100,0	N	91	96,7	N-K	-3,3
	L	86	100,0	N	91	96,7	N-L	-3,3
	M	90	100,0	N	91	96,7	N-M	-3,3

5 Grupo K: sujetos cebados con MenC10-TT + Infanrix™ hexa; Grupo L: sujetos cebados con Hib10-MenC10-TT + Infanrix™ penta; Grupo M: sujetos cebados con Hib5-MenC5-TT + Infanrix™ penta; Grupo N: sujetos cebados con Meningitec™ + Infanrix™ hexa; N: número de sujetos con resultados disponibles. Se lograron títulos de SBA más altos contra MenC al cebar con el tamaño más grande de MenC (grupos K, L y M) en comparación con el cebado con el conjugado de MenC-oligosacárido Meningitec™.

Memoria inmunitaria (cohorte ATP para la inmunogenicidad)

10 La administración de una dosis de 1/5 de la vacuna de polisacáridos simples ACWY provocó títulos muy altos de SBA-MenC en los cuatro grupos cebados, con un 98,7 a 100% y un 97,5 a 100% de sujetos cebados con un régimen de vacuna candidata que mostraron títulos ≥1:8 y ≥1:128, respectivamente. En el grupo cebado con el régimen Meningitec™, hubo una tendencia a un menor porcentaje de sujetos con títulos ≥1:128 (91,8%). En comparación, el 17,6% de los sujetos no cebados tenían títulos de SBA MenC ≥ 1:8 y ≥1:128.

Ejemplo 4 Ensayo clínico de fase II de la vacuna conjugada HibMenAC -TT mezclada con DTPw-HepB

15 **Diseño del estudio:** Estudio abierto, aleatorio (1:1:1:1), en un solo centro, con cinco grupos. Los cinco grupos recibieron el siguiente régimen de vacunación, respectivamente, a las 6, 10 y 14 semanas de edad.

- Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2,5/2,5/2,5: en adelante denominado 2,5/2,5/2,5
- Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2,5/5/5: en adelante denominado 2,5/5/5
- Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 5/5/5: en adelante, 5/5/5

- Tritanrix™-HepB + Hiberix™: en adelante, Hiberix
- Tritanrix.-HepB/Hiberix™ + Meningitec™: en adelante Meningitec. Se tomaron muestras de sangre en el momento de la primera dosis de vacuna (Pre) y un mes después de la tercera dosis de vacuna (Post-dosis 3).

Tritanrix es una vacuna DTPw comercializada por GlaxoSmithKline Biologicals S.A.

- 5 Se utilizaron 105 sujetos en cada uno de los cinco grupos, con un total de 525 sujetos en el estudio.

Tabla 4 Contenido de las formulaciones de las vacunas de GSK

Componentes por dosis (0,5ml)	2,5/2,5/2,5*	2,5/5/5	5/5/5
Polisacárido capsular Hib PRP conjugado con toxoide tetánico (TT)	2,5µg	2,5µg	5µg
Polisacárido capsular (PSA) de <i>Neisseria meningitidis</i> A conjugado con TT	2,5µg	5µg	5µg
Polisacárido capsular C de <i>Neisseria meningitidis</i> (PSC) conjugado con TT	2,5µg	5µg	5µg
* La vacuna 2,5/2,5/2,5 era una dilución de dosis de la vacuna Hib-MenAC 5/5/5 de GSK Biologicals que contenía 2,5µg de cada una de las vacunas PRP-TT, MenA-TT y MenC-TT.			

- 10 Las formulaciones de la vacuna Hib-MenAC se mezclaron extemporáneamente con Tritanrix-HepB. La vacuna combinada de difteria-tétanos-tosis de células enteras - hepatitis B (DTPw-HB) de GSK Biologicals contiene no menos de 30 unidades internacionales (UI) de toxoide diftérico, no menos de 60 UI de toxoide tetánico, no menos de 4 UI de Bordetella pertussis muerta y 10µg de antígeno de superficie de la hepatitis B recombinante.

Terapia de referencia, dosis, modo de administración, Núm. de lote:

- 15 *Calendario/sitio de vacunación:* Un grupo recibió la vacuna Tritanrix.-HepB por vía intramuscular en el muslo izquierdo y Hiberix por vía intramuscular en el muslo derecho a las 6, 10 y 14 semanas de edad. Otro grupo recibió la vacuna Tritanrix.-HepB/Hiberix por vía intramuscular en el muslo izquierdo y la vacuna Meningitec por vía intramuscular en el muslo derecho a las 6, 10 y 14 semanas de edad.

Vacuna/composición/dosis/número de lote: La vacuna Tritanrix.-HepB utilizada fue la descrita anteriormente.

- 20 Una dosis (0,5 ml) de la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b de GSK Biologicals: Hiberix™ contenía 10 µg de PRP conjugado con toxoide tetánico. En el Grupo Hiberix™, se mezcló con diluyente estéril y en el Grupo Meningitec™ se mezcló con Tritanrix™-HepB.

Una dosis (0,5 ml) de la vacuna MENINGITEC™ de Wyeth Lederle contenía: 10 µg de oligosacárido capsular de meningococo grupo C conjugado con 15 µg de proteína CRM197 de *Corynebacterium diphtheria* y aluminio como sales.

Resultados - respuestas inmunitarias generadas contra Hib, MenA y MenC

25

Tabla 5a Anti - PRP (µg/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95% de CL	LI LS	%	95% de CL	LI LS	%	95% de CL	LI LS	%	95% de CL	LI LS	%	95% de CL	LI LS
%≥0,15	100	96,5	100	99	94,8	100	100	96,5	100	100	96,5	100	100	96,5	100
GMC	20,80	15,96	27,10	22,62	17,72	28,88	19,36	15,33	24,46	38,55	29,93	49,64	10,94	8,62	13,88

Tabla 5b SBA -MenC

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95% de CL	LI LS	%	95% de CL	LI LS	%	95% de CL	LI LS	%	95% de CL	LI LS	%	95% de CL	LI LS
%≥1:8	99	94,7	100	100	96,5	100	100	96,5	100	2,9	0,6	8,4	100	96,5	100
GMT	3132	2497	3930	4206	3409	5189	3697	3118	4384	4,7	3,9	5,6	4501	3904	5180

Tabla 5c SBA MenA

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95% de CL		%	95% de CL		%	95% de CL		%	95% de CL		%	95% de CL	
	GMC/T	LI	LS	GMC/T	LI	LS	GMC/T	LI	LS	GMC/T	LI	LS	GMC/T	LI	LS
%≥1:8	99,7	91,9	99,7	100	95,8	100	100	96,2	100	6,8	2,5	14,3	9,1	4,0	17,1
GMT	316,7	251,4	398,9	418,5	358,6	488,5	363	310,5	424,4	5,6	4,3	7,4	5,6	4,4	7,2

Tabla 5d Anti-PSC (µg/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95% de CL		%	95% de CL		%	95% de CL		%	95% de CL		%	95% de CL	
	GMC/T	LI	LS	GMC/T	LI	LS	GMC/T	LI	LS	GMC/T	LI	LS	GMC/T	LI	LS
%≥0,3	100	96,5	100	100	96,4	100	100	96,5	100	8,2	3,6	15,6	100	96,5	100
GMC	49,03	43,24	55,59	71,11	62,49	80,92	61,62	54,88	69,20	0,17	0,15	0,19	58,02	51,42	65,46

Tabla 5e Anti - PSA (µg/ml)

Grupo	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95% de CL	LI LS	%	95% de CL	LI LS	%	95% de CL	LI LS	%	95% de CL	LI LS	%	95% de CL	LI LS
%≥0,3	100	96,4	100	100	96,5	100	99,0	94,8	100	1,0	0,0	5,4	5,9	2,2	12,5
GMC	18,10	15,34	21,35	26,51	22,93	30,79	23,40	20,05	27,30	0,15	0,15	0,15	0,17	0,15	0,18

Conclusión

Una comparación de los resultados de inmunogenicidad obtenidos con la vacuna conjugada de oligosacáridos MenC-CRM197 y las tres formulaciones de GSK que contienen conjugados de polisacáridos MenA-TT y MenC -TT mostró que los conjugados de polisacáridos Men fueron capaces de provocar una buena respuesta inmunogénica similar a la lograda con la vacuna conjugada de oligosacáridos Meningitec. Todas las fórmulas probadas dieron respuesta a MenC en el 100% de los pacientes.

Ejemplo 5 - Ensayo clínico de fase II administración de Hib MenCY concomitante con Infanrix penta de acuerdo con un esquema de 2, 3 y 4 meses

Diseño del estudio: Un estudio multicéntrico de fase II, abierto (parcialmente doble ciego*), aleatorizado y controlado, con 5 grupos que recibieron un esquema primario de tres dosis con las siguientes vacunas:

Grupo Hib-MenCY 2,5/5/5: Hib-MenCY (2.5/5/5) + Infanrix™ penta
 Grupo Hib-MenCY 5/10/10: Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix™ penta
 Grupo Hib-MenCY 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix™ penta
 Grupo Hib-MenC: Hib-MenC (5/5) + Infanrix™ penta
 Grupo Menjugate: Menjugate™** + Infanrix™ hexa (control).

*Hib-MenCY 2,5/5/5, Hib-MenCY 5/10/10 y Hib-MenC se administraron a doble ciego, mientras que el grupo Hib-MenCY 5/5/5 y el grupo Menjugate fueron abiertos. Las formulaciones 2,5/5/5, 5/10/10 y 5/5/5 de Hib-MenCY contienen polisacáridos nativos de MenC y polisacáridos de MenY microfluidizados.

**Menjugate™ contiene 10µg de oligosacáridos MenC conjugados con 12,5 a 25µg de CRM197 por dosis y es producido por Chiron.

Vacunación a los +/- 2, 3, 4 meses de edad (Estudio Mes 0, Mes 1 y Mes 2), y muestras de sangre (3,5ml) de todos los sujetos antes y un mes después de la vacunación primaria (Estudio Mes 0 y Mes 3).

Vacuna de estudio, dosis, modo de administración, número de lote: Tres dosis inyectadas por vía intramuscular a intervalos de un mes, aproximadamente a los 2, 3 y 4 meses de edad, de la siguiente manera

Tabla 6: Vacunas administradas (estudio y control), grupo, calendario/sitio y dosis

Grupo	Horario (meses de edad)	Dosis de vacuna administrada Sitio: Muslo superior izquierdo	Vacuna concomitante administrada Sitio: Muslo superior derecho
Hib-MenCY 2,5/5/5	2, 3 y 4	Hib (2,5µg)-MenC-TT (5µg)-MenY-TT (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenCY 5/10/10	2, 3 y 4	Hib (5µg)-MenC-TT (10µg)-MenY-TT (10µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenCY 5/5/5	2, 3 y 4	Hib (5µg)-MenC-TT (5µg)-MenY-TT (5µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenC	2, 3 y 4	Hib (5µg)-Men C (5µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Menjugate™	2, 3 y 4	Menjugate™	DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix™ hexa)

Inmunogenicidad: Medición de los títulos/concentraciones de anticuerpos contra cada antígeno de la vacuna:

Antes de la primera dosis (Mes 0) y aproximadamente un mes después de la tercera dosis (Mes 3) en todos los sujetos para: SBA-MenC y SBA-MenY, anti-PSC y anti-PSY, anti-PRP, anti-T, anti-FHA, anti-PRN y anti-PT. Mediante el uso de la actividad bactericida del suero contra los serogrupos C e Y de *N. meningitidis* (corte SBA-MenC y SBA-MenY: 1:8 y 1:128); ensayos ELISA con puntos de corte: $\geq 0,3$ µg/ml y ≥ 2 µg/ml para los polisacáridos de los serogrupos C e Y de *N. meningitidis* (anti-PSC IgG y anti-PSY IgG); $\geq 0,15$ µg/ml y $\geq 1,0$ µg/ml para el polisacárido Hib polirribosil-ribitol-fosfato (anti-PRP IgG); 5EL.U/ml para anti-FHA, anti-PRN, anti-PT; $\geq 0,1$ IU/ml de toxoide antitetánico (anti-TT). Sólo al mes de la tercera dosis (mes 3) en todos los sujetos para: anti-D, anti-HB y anti-polio 1, 2 y 3. Utilización de ensayos ELISA con puntos de corte: 0,1 UI/ml para la antidifteria (anti-D); ≥ 10 mIU/ml para la antihepatitis B (anti-HB); y punto de corte del ensayo de microneutralización: 1:8 para los antipolio de tipo 1, 2 y 3 (antipolio 1, 2 y 3).

Procedimientos estadísticos:

Se calcularon las tasas de seroprotección/seropositividad y las concentraciones/títulos geométricos medios (GMC/GMT) con intervalos de confianza del 95% (95% de IC) por grupo, para SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-

5 PSY, anti-PRP, anti-Tetanus, anti-PT, anti-FHA y anti-PRN antes y un mes después de la vacunación; para anti-Difteria, anti-HBs, anti-Polio 1, anti-Polio 2 y anti-Polio 3 un mes después de la vacunación. También se calculó la respuesta a la vacuna (aparición de anticuerpos en sujetos inicialmente seronegativos o al menos el mantenimiento de las concentraciones de anticuerpos en sujetos inicialmente seropositivos) con un IC del 95% para anti-PT, anti-PRN y anti-FHA un mes después de la vacunación. También se presentan las curvas acumulativas inversas para cada anticuerpo en el mes 3. Las diferencias entre los grupos Hib-MenCY y Hib- MenC, en comparación con el grupo de control Menjugate™ se evaluaron de forma exploratoria para cada anticuerpo, excepto para SBA-MenY y anti-PSY, en términos de (1) la diferencia entre el grupo Menjugate™ (menos los grupos Hib-MenCY y Hib-MenC para el porcentaje de sujetos por encima de los puntos de corte especificados o con una respuesta a la vacuna con su IC estandarizado asintótico del 95%, (2) las proporciones de GMC o GMT del grupo Menjugate™ sobre los grupos Hib-10 MenCY y Hib-MenC con su IC del 95%. Se llevaron a cabo las mismas comparaciones para evaluar la diferencia entre cada par de formulaciones Hib-MenCY para los anticuerpos anti-PRP, SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY y anti-TT.

15 Las incidencias globales de los síntomas solicitados locales y generales se calcularon por grupo de acuerdo con el tipo de síntoma, su intensidad y su relación con la vacunación (como porcentajes de sujetos que informaron de síntomas generales, locales y cualquier síntoma solicitado en los 8 días siguientes a la vacunación y su IC exacto del 95%). Se calcularon las incidencias de los síntomas no solicitados por grupo. En el caso de los síntomas de Grado 3, se proporcionó el inicio ≤48 horas, la atención médica, la duración, la relación con la vacunación y los resultados. Los Eventos Adversos Graves se describieron en su totalidad.

20 **Tasas de seroprotección/seropositividad & GMC/Ts (cohorte ATP para la inmunogenicidad)**

Tabla 7a Anti - PRP (µg/ml)

Grupo	N	%≥ 0,15	LI	LS	≥1	LI	LS	GMC	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	67	100,0	94,6	100,0	98,5	92,0	100,0	9,01	7,25	11,21
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	98,5	92,0	100,0	9,49	7,72	11,65
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	98,6	92,3	100,0	8,08	6,53	9,98
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	98,6	92,7	100,0	10,44	8,49	12,83
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	80,3	69,1	88,8	2,60	1,97	3,43

Tabla 7b SBA -MenC (Título)

Grupo	N	%≥ 1:8	LI	LS	≥1:128	LI	LS	GMT	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	95,7	88,0	99,1	1005,8	773,5	1308,0
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	94,0	85,4	98,3	1029,8	799,7	1326,0
Hib MenCY 5/5/5	71	100,0	94,9	100,0	94,4	86,2	98,4	906,9	691,3	1189,8
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	95,9	88,6	99,2	871,0	677,3	1120,0
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	3557,6	2978,8	4248,8

Tabla 7c Anti-PSC (µg/ml)

Grupo	N	%≥ 0,3	LI	LS	≥2	LI	LS	GMC	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100,0	94,8	100,0	100,0	94,8	100,0	21,70	18,36	25,65
Hib MenCY 5/10/10	66	100,0	94,6	100,0	100,0	94,6	100,0	27,26	23,26	31,95

ES 2 898 451 T3

Grupo	N	% \geq 0,3	LI	LS	\geq 2	LI	LS	GMC	LI	LS
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	19,02	16,49	21,93
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	100,0	95,1	100,0	21,08	18,24	24,35
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	38,49	33,64	44,05

Tabla 7d SBA-MenY (Título)

Grupo	N	% \geq 1:8	LI	LS	\geq 1:128	LI	LS	GMT	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	69	97,1	89,9	99,6	92,8	83,9	97,6	470,7	351,1	631,2
Hib MenCY 5/10/10	66	97,0	89,5	99,6	86,4	75,7	93,6	437,1	322,0	593,48
Hib MenCY 5/5/5	71	98,6	92,4	100,0	95,8	88,1	99,1	635,3	501,5	804,8
Hib MenC	74	21,6	12,9	32,7	13,5	6,7	23,5	9,3	6,3	13,7
Menjugate™	71	19,7	11,2	30,9	9,9	4,1	19,3	7,5	5,4	10,4

Tabla 7e Anti - PSY (μ g/ml)

Grupo	N	% \geq 0,3	LI	LS	\geq 2	LI	LS	GMC	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100,0	94,8	100,0	100,0	94,8	100,0	26,86	22,86	31,56
Hib MenCY 5/10/10	66	100,0	94,6	100,0	100,0	94,6	100,0	37,02	31,84	43,04
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	23,57	19,94	27,86
Hib MenC	74	8,1	3,0	16,8	4,1	0,8	11,4	0,19	0,15	0,25
Menjugate™	71	5,6	1,6	13,8	1,4	0,0	7,6	0,17	0,15	0,19

Tabla 7f Anti-tétanos (UI/ml)

Grupo	N	% \geq 0,1	LI	LS	GMC	LI	LS
Hib MenCY 2,5/5/5	68	100,0	94,7	100,0	3,06	2,63	3,55
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	3,25	2,88	3,68
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	2,97	2,59	3,41
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	3,15	2,73	3,64
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	1,66	1,39	1,97

Grupo Hib-MenCY 2,5/5/5: Hib-MenCY (2,5/5/5) + Infanrix™ penta
Grupo Hib-MenCY 5/10/10: Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix™ penta
Grupo Hib-MenCY 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix™ penta
Grupo Hib-MenC: Hib-Men (5/5) + Infanrix™ hexa

Grupo	N	% ≥ 0,1	LI	LS	GMC	LI	LS
Grupo Menjugate: Menjugate™ + Infanrix™ penta N = número de sujetos con resultados disponibles. % = porcentaje de sujetos con concentración/título dentro del intervalo especificado GMC/T: concentración/título medio geométrico 95% IC = intervalo de confianza del 95%; LI = límite inferior; LS = límite superior							

Conclusión

Los conjugados de polisacáridos MenC e Y produjeron una buena respuesta inmunitaria en todos los sujetos, el 100% de los sujetos produjeron respuestas superiores a 0,3 µg/ml contra MenC y MenY.

5 **Ejemplo 6 - Ensayo clínico de fase II que compara tres formulaciones de MenACWY-TT con la vacuna conjugada de oligosacárido- Meningitec MenC-CRM197.**

10 En este ejemplo se informa sobre un estudio de fase II, abierto (parcialmente ciego), aleatorizado y controlado por intervalos de dosis para evaluar la inmunogenicidad de tres formulaciones diferentes de la vacuna conjugada contra el toxoide tetánico de los serogrupos A, C, W-135 e Y de GlaxoSmithKline Biological (MenACWY-TT) en comparación con una vacuna conjugada de oligosacárido MenC-CRM197 (Meningitec™) cuando se administra en una dosis a niños de 12 a 14 meses.

El ensayo clínico fue un estudio abierto (parcialmente doble ciego*), controlado y multicéntrico en el que los sujetos elegibles de 12 a 14 meses fueron asignados al azar (1:1:1:1) a uno de los cuatro grupos paralelos de 50 sujetos para recibir una dosis primaria única en la Visita 1 de la siguiente manera:

- 15 Forma 1T: MenACWY-TT a una dosis de 2,5 µg de polisacárido MenA conjugado con toxoide tetánico (TT), 2,5 µg de polisacárido MenC conjugado con TT, 2,5 µg de polisacárido MenW conjugado con TT y 2,5 µg de polisacárido MenY conjugado con TT.
- 20 Forma 2T: MenACWY-TT a una dosis de 5 µg de polisacárido MenA conjugado con TT, 5 µg de polisacárido MenC conjugado con TT, 5 µg de polisacárido MenW conjugado con TT y 5 µg de polisacárido MenY conjugado con TT.
- Forma 3T: MenACWY-TT a una dosis de 2,5 µg de polisacárido MenA conjugado con TT, 10 µg de polisacárido MenC conjugado con TT, 2,5 µg de polisacárido MenW conjugado con TT y 2,5 µg de polisacárido MenY conjugado con TT.
- Ctrl T: 10 µg de oligosacárido MenC conjugado con 12,5 a 25 µg de CRM197 (Meningitec).

*Las tres formulaciones diferentes de MenACWY-TT se administraron de una manera doble ciega.

25 **Calendario/sitio de vacunación:** Se administró una única dosis de vacuna por vía intramuscular en el deltoide izquierdo en la Visita 1 (Mes 0 del estudio) de acuerdo con la asignación aleatoria. Todas las vacunas candidatas se suministraron en forma de gránulos liofilizados en un vial monodosis (0,5 ml tras la reconstitución con el diluyente salino suministrado).

30 **Inmunogenicidad:** Medición de títulos/concentraciones de anticuerpos contra los componentes del antígeno de la vacuna meningocócica en muestras de sangre obtenidas antes de la dosis de la vacuna del estudio (Mes 0) y aproximadamente un mes después de la dosis de la vacuna del estudio (Mes 1) en todos los sujetos. Determinación de los títulos de anticuerpos bactericidas contra los serogrupos A, C, W-135 e Y de *N. meningitidis* (SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW y SBA-MenY) por medio de una prueba bactericida (puntos de corte del ensayo: una dilución de 1:8 y 1:128) y medición por medio de ELISA de los anticuerpos contra los serogrupos A, C, W-135 e Y de *N. meningitidis* de los serogrupos A, C, W-135 e Y (anti-PSA, anti-PSC, anti-PSW y anti-PSY, puntos de corte del ensayo ≥0,3 µg/ml y ≥2 µg/ml), y toxoide tetánico (anti-tétanos, punto de corte del ensayo 0,1 UI/ml).

Resultados

40 La respuesta de anticuerpos en términos del porcentaje de respondedores de SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW y SBA-MenY un mes después de la vacunación (el criterio de valoración primario) se muestra en la Tabla 8. Una respuesta se define como un aumento mayor o igual a 4 veces para los sujetos seropositivos o una seroconversión para los sujetos seronegativos antes de la vacunación.

ES 2 898 451 T3

Tabla 8: Respuestas al anticuerpo SBA un mes después de la vacunación

Anticuerpo	Grupo	N	%	LI	LS
SBA-MenA	Forma 1T	42	61,9	45,6	76,4
	Forma 2T	39	82,1	66,5	92,5
	Forma 3T	40	62,5	45,8	77,3
	Meningitec™	36	11,1	3,1	26,1
SBA-MenC	Forma 1T	46	97,8	88,5	99,9
	Forma 2T	43	100,0	91,8	100,0
	Forma 3T	44	95,5	84,5	99,4
	Meningitec™	49	91,8	80,4	97,7
SBA-MenW	Forma 1T	45	100,0	92,1	100,0
	Forma 2T	43	97,7	87,7	99,9
	Forma 3T	45	100,0	92,1	100,0
	Meningitec™	46	15,2	6,3	28,9
SBA-MenY	Forma 1T	47	97,9	88,7	99,9
	Forma 2T	44	88,6	75,4	96,2
	Forma 3T	45	93,3	81,7	98,6
	Meningitec™	49	4,1	0,5	14,0

La Tabla 9 muestra el número de sujetos que alcanzaron títulos de SBA por encima de los puntos de corte de 1:8 y 1:128, así como los GMT.

Tabla 9: Tasas de seropositividad y GMT para anticuerpos SBA un mes después de la vacunación

	Grupo	N	%	≥1:8 LI	LS	%	≥1:128 LI	LS	GMT
SBA-MenA	Forma 1T	46	100	92,3	100	100	92,3	100	1457,3
	Forma 2T	45	100	92,1	100	97,8	88,2	99,9	1776,9
	Forma 3T	48	97,9	88,9	99,9	97,9	88,9	99,9	1339,5
	Meningitec™	41	51,2	35,1	67,1	43,9	28,5	60,3	42,8
SBA-MenC	Forma 1T	47	97,9	88,7	99,9	78,7	64,3	89,3	281,3
	Forma 2T	45	100	92,1	100	84,4	70,5	93,5	428,6
	Forma 3T	47	95,7	85,5	99,5	85,1	71,7	93,8	478,4
	Meningitec™	50	94,0	83,5	98,7	62,0	47,2	75,3	200,1
SBA-MenW	Forma 1T	47	100	92,5	100	100	92,5	100	2529,1

	Grupo	N	%	≥1:8 LI	LS	%	≥1:128 LI	LS	GMT
	Forma 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	2501,6
	Forma 3T	48	100	92,6	100	97,9	88,9	99,9	2300,2
	Meningitec™	48	27,1	15,3	41,8	6,3	1,3	17,2	9,4
SBA-MenY	Forma 1T	47	100	92,5	100	100	92,5	100	1987,4
	Forma 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	2464,8
	Forma 3T	48	100	92,6	100	97,9	88,9	99,9	2033,7
	Meningitec™	49	49,0	34,4	63,7	28,6	16,6	43,3	25,0

5 La vacunación con las tres formulaciones del conjugado de polisacáridos ACWY-TT dio lugar a buenas respuestas de SBA contra MenA, MenC, MenW y MenY, con un 95 a 100% de sujetos con títulos superiores a 1:8. En particular, las formulaciones 5/5/5/5 y 2,5/10/2,5/2,5 de los conjugados de polisacáridos produjeron una mayor respuesta frente a MenC que la vacuna de oligosacáridos Meningitec™, como se observa en la mayor proporción de sujetos con un título superior a 1:128 y en las lecturas del GMT.

Tabla 10 Tasas de seropositividad y GMC para los anticuerpos antipolisacáridos un mes después de la vacunación

	Grupo	N	%	≥0,3µg /ml LI	LS	%	≥2µg/ ml LI	LS	GMC µg/ml
Anti-MenA	Forma 1T	47	93,6	82,5	98,7	68,1	52,9	80,9	2,35
	Forma 2T	45	100	92,1	100	64,4	48,8	78,1	3,11
	Forma 3T	48	95,8	85,7	99,5	37,5	24,0	52,6	1,65
	Meningitec™	50	10,0	3,3	21,8	2,0	0,1	10,6	0,18
Anti-MenC	Forma 1T	47	100	92,5	100	100	92,5	100	9,57
	Forma 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	12,53
	Forma 3T	47	100	92,5	100	97,9	88,7	99,9	19,29
	Meningitec™	49	98,0	89,1	99,9	93,9	83,1	98,7	7,95
Anti-MenW	Forma 1T	47	100	92,5	100	80,9	66,7	90,9	4,56
	Forma 2T	45	100	92,1	100	93,3	81,7	98,6	6,83
	Forma 3T	48	93,8	82,8	98,7	72,9	58,2	84,7	2,88
	Meningitec™	50	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0	7,1	0,15
Anti-MenY	Forma 1T	47	100	92,5	100	97,9	88,7	99,9	8,90
	Forma 2T	45	100	92,1	100	100	92,1	100	12,78
	Forma 3T	47	97,9	88,7	99,9	87,2	74,3	95,2	5,67
	Meningitec™	50	2,0	0,1	10,6	0,0	0,0	7,1	0,15

Las tres formulaciones de la vacuna conjugada de polisacáridos ACWY-TT produjeron buenas respuestas inmunitarias contra MenA, MenC, MenW y MenY, con entre el 93% y el 100% de los sujetos que alcanzaron títulos superiores a 0,3µg/ml. Se obtuvieron mayores lecturas de GMC mediante el uso de las formulaciones 5/5/5/5 y 2/5/10/2,5/2,5 de la vacuna conjugada de polisacáridos ACWY-TT en comparación con Meningitec™.

5 **Ejemplo 7 - comparación de la inmunogenicidad de los conjugados de polisacáridos MenY nativos y dimensionados**

10 Los ratones (hembras DBA/2 de 6 a 8 semanas) recibieron dos inyecciones, con 2 semanas de diferencia, de PSY-TT por vía subcutánea. Se tomaron muestras de sangre 14 días después de la segunda inyección a fin de llevar a cabo ELISA anti-PSY y SBA mediante el uso de la cepa S1975 menY. Por cada inyección, los ratones recibieron 1 µg de PSY-TT (formulación lio no-ads).

Se utilizaron los conjugados descritos en la tabla 11.

Tabla 11

Conjugados PSY microfluidización	ENYTT012 NO	ENYTT014 Sí (40 ciclos)	ENYTT015 bis Sí (20 ciclos)
Proporción de TT/PS	1/1	1/1	1/1

Resultados

15 Los resultados (Figura 1) muestran una tendencia hacia una mayor inmunogenicidad para los conjugados preparados con PSY de tamaño. La Figura 1A muestra los resultados de GMC obtenidos en un ELISA para antisueros criados contra conjugados preparados a partir de MenY nativo (ENYTT012), MenY microfluidizado - 40 ciclos (ENYTT014) y MenY microfluidizado - 20 ciclos (ENYTT015 bis). Se obtuvieron mayores GMC cuando el MenY-TT se preparó a partir de MenY microfluidizado.

20 Se obtuvieron resultados similares cuando los antisueros se evaluaron por medio del ensayo SBA (Figura 1B). Una vez más, los valores más altos de GMT se lograron mediante el uso de conjugados preparados a partir de MenY microfluidizados.

Ejemplo 8 - Ensayo clínico para evaluar el efecto de un enlazador en MenA en una vacuna conjugada MenACWY

25 Se administró una dosis única de diferentes formulaciones de la vacuna MenACWY a adolescentes de 15 a 19 años en 5 grupos de 25 sujetos en un ensayo aleatorio 1:1:1:1. Las formulaciones probadas fueron:

- F1 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico con el conjugado MenA que contiene un espaciador AH - 5/5/5µg
- F2 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico con el conjugado MenA que contiene un espaciador AH - 2,5/5/2,5/2,5µg
- 30 F3 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico con el conjugado MenA que contiene un espaciador AH - 5/5/2,5/2,5µg
- F4 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico sin espaciador en ningún conjugado - 5/5/5µg
- Grupo de control - Mencevax™ ACWY

El día 30 después de la inoculación, se tomó una muestra de sangre de los pacientes.

35 Las muestras de sangre se utilizaron para evaluar el porcentaje de respondedores de SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW135 y SBA-MenY un mes después de la dosis de vacuna. La respuesta a la vacuna se definió como 1) para los sujetos inicialmente seronegativos: un título de anticuerpos postvacunación ≥ 1/32 al mes o 2) para los sujetos inicialmente seropositivos: un título de anticuerpos ≥ 4 veces el título de anticuerpos anterior a la vacunación.

Resultados

40 Como se muestra en la Tabla 13, el uso de un espaciador en el conjugado MenA condujo a una mayor respuesta inmune contra MenA. El porcentaje de respondedores aumentó del 66% al 90 a 95% cuando se añadió el espaciador AH. Esto se reflejó en un aumento de la SBA GMT de 4335 a 10000 y un aumento del GMC de 5 a 20-40. Sorprendentemente, el uso de un espaciador de AH también condujo a un aumento de la respuesta inmune contra el MenC, como se ve por un aumento en el porcentaje de respondedores y un aumento en la SBA GMT. También se observó un aumento de la SBA-GMT frente a MenY (6742 a 7122) y frente a MenW (4621 a 5418) cuando se introdujo un espaciador.

45

ES 2 898 451 T3

Tabla 12

Formulación	% de respondedores de MenA SBA	GMT de SBA-MenA	Anti-PSA GMC µg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	90,9	9805	20,38
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	75	8517	29,5
F3 5AH/5/2,5/2,5	95,5	10290	47,83
F4 5/5/5/5	66,7	4335	5,46
Mencevax™	85,7	8022	27,39
Formulación	% de respondedores de MenC SBA	GMT de SBA-MenC	Anti-PSC GMC µg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	69,6	3989	12,11
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	81,8	3524	12,78
F3 5AH/5/2,5/2,5	81,8	3608	8,4
F4 5/5/5/5	73,9	2391	8,84
Mencevax™	90,0	5447	38,71
Formulación	% de respondedores de MenW SBA	GMT de SBA-MenW	Anti-PSW GMC µg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	95	5418	9,65
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	85	4469	14,55
F3 5AH/5/2,5/2,5	95,5	4257	6,39
F4 5/5/5/5	95,5	4621	10,7
Mencevax™	86,4	2714	13,57
Formulación	% de respondedores de MenY SBY	GMT de SBA-MenY	Anti-PSY GMC µg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	91,3	7122	16,3
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	87,5	5755	12,52
F3 5AH/5/2,5/2,5	80	5928	8,88
F4 5/5/5/5	91,3	6742	13,88
Mencevax™	91,7	4854	21,02

Ejemplo 9 - Ensayo clínico para evaluar el efecto de un enlazador en los conjugados MenA y MenC en una vacuna conjugada MenACWY

5 Se administró una dosis única de diferentes formulaciones de la vacuna MenACWY a adolescentes de 15 a 19 años en 5 grupos de 25 sujetos en un ensayo aleatorio 1:1:1:1. Las formulaciones probadas fueron:

- 10 F1 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico con los conjugados MenA y MenC que contienen un espaciador AH - 2,5/2,5/2,5/2,5µg
 F2 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico con los conjugados MenA y MenC que contienen un espaciador AH - 5/5/2,5/2,5µg
 F3 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico con los conjugados MenA y MenC que contienen un espaciador AH - 5/5/5/5µg
 F4 - MenACWY conjugado con toxoide tetánico con el conjugado MenA que contiene un espaciador AH- 5/5/5/5µg
 Grupo de control - Mencevax™ ACWY

El día 30 después de la inoculación, se tomó una muestra de sangre de los pacientes.

15 Las muestras de sangre se utilizaron para evaluar el porcentaje de respondedores de SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW135 y SBA-MenY un mes después de la dosis de vacuna. La respuesta a la vacuna se definió como 1) para los sujetos inicialmente seronegativos: un título de anticuerpos postvacunación ≥ 1/32 al mes o 2) para los sujetos inicialmente seropositivos: un título de anticuerpos ≥ 4 veces el título de anticuerpos anterior a la vacunación.

Resultados

20 La introducción de un espaciador AH en el conjugado MenC condujo a un aumento de la respuesta inmune contra MenC, como se muestra en la Tabla 14. Esto se demuestra con un aumento de la SBA GMT de 1943 a 4329 y un aumento de la anti-PSC GMC de 7,65 a 13,13. Se mantuvieron las buenas respuestas inmunitarias contra MenA, MenW y MenY.

Tabla 13

Formulación	% de respondedores de MenA SBA	GMT de SBA-MenA	Anti-PSA GMC µg/ml ELISA
F 12,5AH/2,5AH/2,5/2,5	75	8417	20,23
F2 5AH/5AH/2,5/2,5	72	6299	16,07
F3 5AH/5AH/5/5	87	9264	27,26
F4 5AH/5/5/5	77,3	9632	20,39
Mencevax™	78,3	8284	12,93
Formulación	% de respondedores de MenC SBA	GMT de SBA-MenC	Anti-PSC GMC µg/ml ELISA
F 12,5AH/2,5AH/2,5/2,5	88	3619	12,82
F2 5AH/5AH/2,5/2,5	88	2833	13,32
F3 5AH/5AH/5/5	95,8	4329	13,13
F4 5AH/5/5/5	95,8	1943	7,65
Mencevax™	91,7	1567	16,55
Formulación	% de respondedores de MenW SBA	GMT de SBA-MenW	Anti-PSW GMC µg/ml ELISA
F 12,5AH/2,5AH/2,5/2,5	100	5656	7
F2 5AH/5AH/2,5/2,5	96	4679	5,4

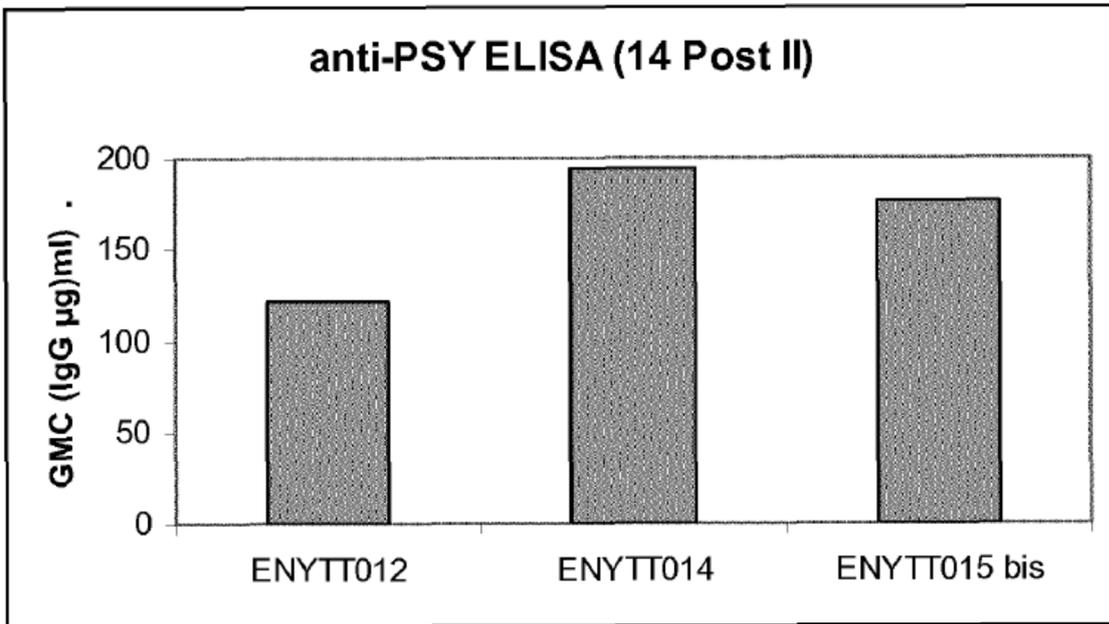
ES 2 898 451 T3

Formulación	% de respondedores de MenA SBA	GMT de SBA-MenA	Anti-PSA GMC µg/ml ELISA
F3 5AH/5AH/5/5	91,3	4422	4,45
F45AH/5/5/5	88	4947	7,67
Mencevax™	96	3486	11,93
Formulación	% de respondedores de MenY SBY	GMT de SBA-MenY	Anti-PSY GMC µg/ml ELISA
F 1 2,5AH/2,5AH/2,5/2,5	75	3891	17,81
F2 5AH/5AH/2,5/2,5	92	3968	11,96
F3 5AH/5AH/5/5	79,2	2756	9,51
F4 5AH/5/5/5	80	3914	16,76
Mencevax™	88	3056	21,41

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende al menos 2 sacáridos capsulares diferentes de *N. meningitidis* conjugados por separado con el mismo tipo de proteína portadora, en la que uno o más sacáridos se seleccionan de un primer grupo formado por MenA y MenC que se conjugan con la proteína portadora por medio de un primer tipo de grupo químico en la portadora de proteínas, y uno o más sacáridos diferentes se seleccionan de un segundo grupo formado por MenC, MenY y MenW que se conjugan con la proteína portadora por medio de un segundo tipo de grupo químico en la portadora de proteínas
5
en la que dicha composición comprende sacáridos capsulares MenA y MenC conjugados a través de un enlazador a una o varias proteínas portadoras, y sacáridos capsulares MenY y MenW directamente conjugados a una o varias proteínas portadoras,
10 en la que el enlazador es ADH, y,
en la que la proteína portadora es TT.
2. Una composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el primer tipo de grupo químico es un grupo carboxilo en la portadora de proteínas, y el segundo tipo de grupo químico es un grupo amino en la portadora de proteínas.
15
3. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 y un excipiente aceptable para uso farmacéutico.
4. Un procedimiento de fabricación de la vacuna de la reivindicación 3 que comprende la etapa de mezclar la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 con un excipiente aceptable para uso farmacéutico.
20
5. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1 y 2 para su uso en la prevención de la enfermedad causada por la infección por *Neisseria meningitidis*.

A



B

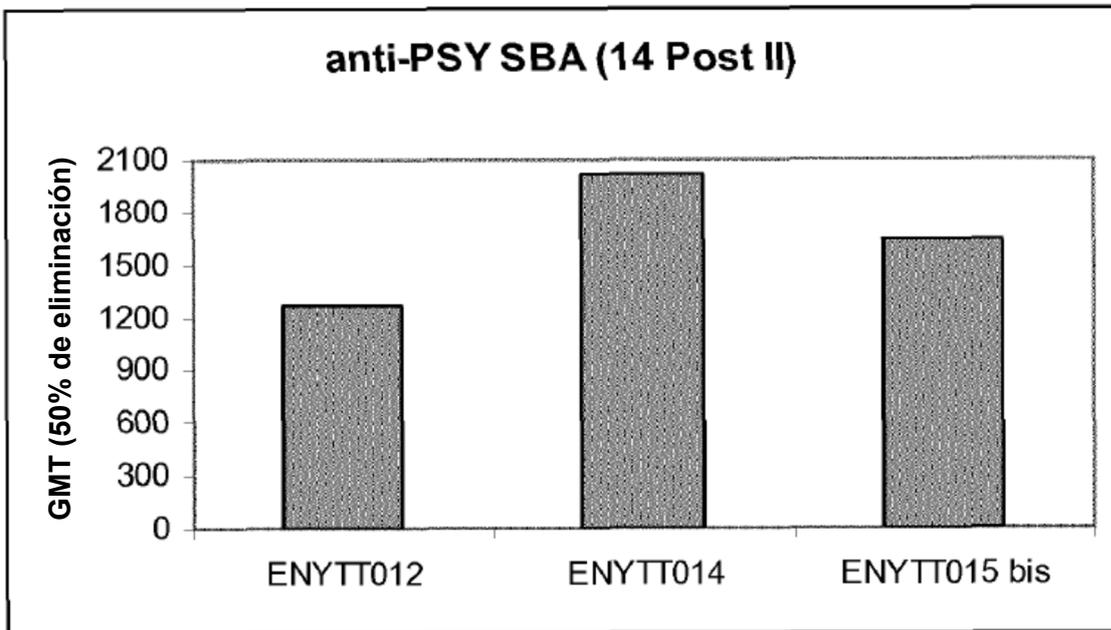


Figura 1