



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 204 967**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **95935550 .4**

86 Fecha de presentación : **02.11.1995**

87 Número de publicación de la solicitud: **0789587**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.08.1997**

54 Título: **Vacuna combinada de la meningitis.**

30 Prioridad: **02.11.1994 GB 9422096**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.05.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **01.07.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **01.07.2008**

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

72 Inventor/es: **Ceccarini, Costante;**
Costantino, Paolo;
D'Ascenzi, Sandro;
Norelli, Francesco y
Giannozzi, Aldo

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 204 967 T5

DESCRIPCIÓN

Vacuna combinada de la meningitis.

5 La presente invención se refiere a una vacuna combinada para el tratamiento de una meningitis bacteriana. En particular, la vacuna combinada protege eficientemente contra la infección por *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib) y *Neisseria meningitidis* (meningococos) serotipos B y C (MenB, MenC).

10 La meningitis bacteriana causada por infección con Hib, MenB y/o MenC representa un problema mundial. La infección por estos organismos puede dar como resultado una incapacidad permanente y muerte entre los niños pequeños. Recientemente, sin embargo, una vacuna conjugada de Hib ha llegado a estar generalmente disponible (véase Force *et al.*, 1992, *Annals of Pharmacology* 26:1429-1440; Vella *et al.*, 1990, *Pediatrics* 85:668-675) y ha dado como resultado un control efectivo de las infecciones por Hib. Vacunas similares pronto estarán disponibles para la infección por MenC y también para la infección por MenB (véase Constantino *et al.*, 1992, *Vaccine*: 10: 691-698). Se conocen
15 vacunas no conjugadas contra Hib y contra MenC (véase Parke *et al.*, 1977, *J. Infect. Dis.* 136, suple, S51-S56).

Las vacunas de Hib y meningococos se basan en conjugados entre oligosacáridos derivados de la superficie bacteriana, que definen los epítomos específicos para la bacteria en cuestión, conjugados a proteínas transportadoras, tales como mutantes no tóxicos de toxina diftérica, por ejemplo CRM197.

20 Las vacunas de combinación están ganando ahora amplia aceptación en los países desarrollados. La razón que hay detrás del uso de vacunas de combinación, que comprenden más de un antígeno y son efectivas para inmunizar al receptor contra una serie de enfermedades, es que el coste de administración de la vacuna se puede reducir drásticamente cuando se compara con un número más grande de vacunas individuales. Como el coste de administración puede exceder más de diez veces el coste de una vacuna, las ventajas de vacunas de combinación son evidentes donde se
25 consideran programas de vacunación masiva. Las vacunas de combinación están siendo promocionadas activamente por la Organización Mundial de la Salud (véanse, por ejemplo, CVI Forum, Nº. 5, Noviembre 1993, pp 212; CVI Report of the First Meeting of the Consultative Group, Ginebra, 16-17 Diciembre 1991, pp. 29-32).

30 Estas ventajas se han reconocido durante cierto tiempo, pero sólo tres de tales vacunas de combinación están ampliamente disponibles en la actualidad. La primera en presentarse, en los años 1950, fue la DTP, una vacuna muerta contra la difteria, el tétano y el *pertussis*. La formulación de esta vacuna triple no presentó problemas mayores ya que los componentes de la combinación son compatibles mutuamente y el conservante (mertiolato) y adyuvante (alúmina) usados en cada vacuna por separado fueron idénticos. Más aun, se encontró que el componente de la célula completa de *pertussis* potenciaba la respuesta inmune ante los toxoides de difteria y tétanos.
35

En los años 1960 se desarrolló una vacuna oral viva para la polio (abreviadamente en inglés OPV) que contenía los tipos 1, 2 y 3 de los virus de la polio. Un problema que se encontró en la formulación de la OPV fue la presencia de una interferencia entre los componentes de la vacuna, un problema que no ha surgido con DTP. El problema se ha
40 minimizado optimizando la concentración de los distintos componentes.

Más recientemente se ha introducido una tercera vacuna de combinación, una vacuna viva de sarampión, paperas y rubéola (abreviadamente en inglés MMR) en la mayoría de los países desarrollados. De nuevo la concentración de cada componente individual necesita ser ajustada para minimizar el fenómeno de interferencia entre los componentes
45 incluidos en esta vacuna.

Actualmente hay una tendencia hacia el desarrollo de supervacunas que comprenden un número mayor de antígenos, basadas en la vacuna DTP.

50 Sin embargo, hay desventajas en la formulación de supervacunas basadas en DTP. La evidencia reciente ha mostrado que la administración de la vacuna de conjugado Hib junto con DTP reduce la efectividad del conjugado Hib en comparación con la administración separada de DTP y vacuna Hib (véase Abstract 300 del 33^{er} ICAAC).

Existen datos conflictivos sobre el papel inmunitario de la proteína transportadora para influir en la respuesta del anticuerpo al hapteno o al componente oligosacárido de una vacuna conjugada. Tal influencia es crítica en la formulación de las vacunas de Hib/MenB/C, ya que las proteínas transportadoras usadas son invariablemente similares o idénticas a los antígenos incluidos en la vacuna DTP, la cual se administra a los niños a una edad temprana. De acuerdo con algunos estudios, la respuesta al conjugado aumenta con una exposición previa al transportador, mientras que según otros se suprime. (Barington, T. *et al.*, *Infection and Immunity* 62:9-14 (1994); Schneerson, R. *et al.*, *J. Exp. Med.* 152:361-376 (1980), Barington T. *et al.*, *Infect. Immun.* 61:432-438 (1993); Peeters, C.C.A.M. *et al.*, *Infect. Immun.* 59:3504-3510).
60

Recientemente se ha determinado que la exposición previa a la proteína transportadora aumenta enormemente la respuesta a la vacuna de conjugado Hib.
65

Según esto, el objeto de la presente invención es proporcionar una vacuna combinada de Hib y meningococo que se puede usar en la profilaxis de una meningitis bacteriana, lo cual permite una vacunación económica, segura y conveniente contra las causas prevalentes de la meningitis.

La invención, por tanto, proporciona una vacuna para la meningitis que comprende oligosacáridos conjugados Hib y MenC.

Se ha encontrado que la vacuna de combinación de la invención es eficaz para prevenir la infección por *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* serotipo C, aumentando los anticuerpos contra los oligosacáridos capsulares conjugados administrados después de la primera dosis. Más aun, la vacuna de combinación ha mostrado estar libre de interferencia entre los antígenos usados.

Ventajosamente la primera exposición al transportador puede aprovecharse con el fin de maximizar la respuesta a la vacuna. La primera exposición al transportador puede llevarse a cabo por administración de una vacuna DTP.

El componente MenC se puede formular en tres configuraciones diferentes preferidas: forma líquida tamponada; liofilizada con un excipiente adecuado; y producto preparado para usar con los adyuvantes pertinentes. La vacuna Hib es estable después de la liofilización con un excipiente adecuado y en una forma líquida tamponada. Además, las dos vacunas, MenC y Hib, se pueden liofilizar juntas con un excipiente adecuado y seguidamente resuspender antes del uso con los adyuvantes adecuados. Cualquier combinación de las formulaciones estables se puede mezclar antes de usarse.

La vacuna de la invención además puede comprender un oligosacárido capsular conjugado derivado de *Neisseria meningitidis* serotipo B.

La proteína transportadora a la que el componente de oligosacárido de la vacuna de la invención está conjugada puede ser cualquier proteína conocida en la técnica para tal fin. Por ejemplo, puede ser un toxoide del tétanos, toxoide diftérico, una proteína de membrana externa de *Neisseria meningitidis*, o un mutante o variante de los mismos.

Preferiblemente los oligosacáridos se seleccionan por tamaño y tienen ventajosamente un grado de polimerización de cuatro o más.

La invención además proporciona un procedimiento para la profilaxis o el tratamiento de la meningitis que comprende administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de una vacuna de combinación según la invención. La pauta preferida de administración es administrar a los dos, cuatro y seis meses de edad, intramuscularmente.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona una vacuna de combinación según la invención para uso en medicina.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la media geométrica respectiva para las concentraciones de anticuerpo ± 2 EE (95% de intervalo de confianza) en sueros obtenidos inmediatamente antes y un mes después de las inyecciones de recuerdo en pacientes previamente expuestos y no expuestos; respuesta de anticuerpos a la vacunación PRP a los doce meses de edad en relación a una vacunación previa con conjugado y una exposición previa con DT;

La Figura 2 muestra el perfil analítico de los oligosacáridos de *H. influenzae* tipo b después de una hidrólisis ácida;

La figura 3 muestra la imagen de una técnica de barrido de azúcares para oligosacáridos FACE de preparaciones de oligosacárido antes y después de una separación por tamaños;

La Figura 4 muestra un perfil analítico cromatográfico de los oligómeros de bajo peso molecular derivados de polisacáridos de *H. influenzae* tipo b después de la separación por tamaños; las tres especies principales se caracterizan según los análisis de espectrografía de masas mostrados en la tabla 4;

La figura 5 muestra el perfil analítico cromatográfico de los oligómeros de alto peso molecular derivados de polisacáridos de *H. influenzae* tipo b, después de la separación por tamaños, y

La figura 6 muestra la reactividad serológica de oligosacáridos de MenC de longitudes variables; Elisa competitiva, serie de sueros humanos de adultos vacunados con la vacuna de polisacárido Men A + C inhibidos por oligosacáridos de Men C de diferentes longitudes de cadena.

Descripción detallada de la invención

Los conjugados Hib y MenC se pueden preparar según la tecnología de conjugación establecida usando oligosacáridos y proteínas transportadoras conocidos en la técnica. Preferiblemente, sin embargo, los conjugados se preparan de acuerdo con un procedimiento que implica conocer el tamaño de los oligosacáridos con el fin de excluir oligómeros de cadena corta.

En el caso de la vacuna Hib, los oligómeros de cadena corta han mostrado ser pobremente inmunogénicos (Peeters *et al.*, J. Infect. Immun. 60, 1826-1833). Además, de igual modo se ha mostrado ahora que los oligómeros de bajo

peso molecular de MenC son pobremente inmunogénicos. Los oligosacáridos que tienen un grado de polimerización de menos de cuatro no son efectivos para inhibir la reacción entre los anticuerpos humanos y los polisacáridos nativos en un ensayo ELISA.

- 5 Las vacunas según la invención pueden ser tanto profilácticas (para prevenir la infección) como terapéuticas (para tratar la enfermedad después de la infección).

10 Dichas vacunas comprenden el antígeno o antígenos normalmente en combinación con “vehículos farmacéuticamente aceptables”, que incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas), y partículas virales inactivas. Tales vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Adicionalmente, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes adicionales (“coadyuvantes”). Además, el antígeno se puede 15 conjugar al toxoide bacteriano, tal como un toxoide de patógenos de difteria, tétanos, cólera, *H. Pylori*, etc.

20 Las composiciones inmunogénicas (por ejemplo, antígeno, vehículo farmacéuticamente aceptable, y coadyuvante) contendrán típicamente diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes en dichos vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes humidificantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, y similares.

25 Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz del coadyuvante y un antígeno, así como cualquier otro componente de los mencionados anteriormente, si es necesario. Se entiende por “cantidad inmunológicamente eficaz” que la administración de esa cantidad a un individuo, tanto en dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y la condición física del individuo a tratar, del grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo primates no humanos, primates, etc.), de la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, del criterio de tratamiento por parte del médico de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encontrará en un intervalo relativamente amplio que 30 puede determinarse mediante ensayos de rutina. El intervalo preferido está entre 2 y 10 μg por dosis.

El tratamiento de dosificación puede planificarse en dosis única, aunque se prefiere una planificación de dosis múltiple B.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

Determinación del efecto de la exposición previa al transportador con la vacuna conjugada Hib

40 Vacunas y sujetos

El ensayo clínico se realizó en los sitios de estudio de St. Louis (N=83) y Minneapolis (N=20). Se distribuyeron al azar 103 niños sanos de aproximadamente un mes de edad para recibir una inyección única de la vacuna de los 45 toxoides de difteria y tétanos (grupo expuesto previamente a DT), o no fueron vacunados. La vacuna DT (lote 1L21121, Connaught Laboratories, Inc, Swiftwater, PA) se administró intramuscularmente, usando una dosis de 0,5 ml. La media \pm DE de las edades de los 52 niños a los que se les administró DT fue de $1,1 \pm 0,1$ meses (intervalo: 0,8 a 1,3 meses). A los dos meses de edad, los niños de cada grupo se distribuyeron además al azar para recibir o tres dosis de HbOC (lote M695HK), o tres dosis de PRP-T (lote S2440), administrado intramuscularmente a los 2, 4 y 6 meses de edad. 50 La dosis de HbOC fue de 10 μg de sacárido y de 25 μg de proteína CRM en 0,5 ml, y la dosis de PRP-T fue de 10 μg de sacárido y 20 μg de proteína, también administrado en 0,5 ml. Se administraron inyecciones separadas de la vacuna DTP (0,5 ml, intramuscularmente, del lote 2G31010, Connaught Laboratories), en la pierna contraria a la de las vacunaciones del conjugado Hib. A los 12 meses de edad, se administraron subcutáneamente 5 μg de vacuna PRP no conjugada en 0,1 ml. La vacuna PRP se proporcionó por NIAID, NIH y se ha descrito previamente (Granoff 55 *et al.*, J. Inf. Dis. 1993; 168:663-671). Las muestras de suero se obtuvieron inmediatamente antes de cada una de las dosis de conjugado Hib/DTP, aproximadamente 4 semanas después de la tercera dosis de conjugado, e inmediatamente antes y 1 mes después de la vacunación PRP. Noventa y cuatro de los 103 niños (91%) completaron el protocolo de vacunación conjugada y son los sujetos incluidos en el análisis del que se informa aquí. Los nueve niños restantes se excluyeron por las siguientes razones: dificultad para obtener muestras de sangre (1); los padres se trasladaron de la ciudad (1); no quisieron participar más (2); no se hizo seguimiento (1); se les administró la vacuna equivocada fuera del estudio sin darse cuenta (2); diagnóstico de inmunodeficiencia subyacente (1); y una convulsión febril no relacionada con la vacunación (1). Las características demográficas de los cuatro grupos de tratamiento usados en los análisis se resumen en la Tabla 1. Los grupos fueron similares respecto a género, raza y edad en la primera dosis de la 65 vacunación conjugada.

TABLA 1

Características demográficas de los grupos de estudio

Vacuna+/ exposición previa a DT a 1 mes	Número de pacientes*	% Varones	% Blancos	Edad (meses) Media \pm DE**
Hb0C				
Expuestos previamente	21	52	90	2,0 \pm 0,20
No expuestos previamente	24	33	92	2,0 \pm 0,16
PRP-T				
Expuestos previamente	25	64	96	2,1 \pm 0,23
No expuestos previamente	24	63	92	2,1 \pm 0,22

+ Hb0C (vacuna conjugada de oligosacárido b de *Haemophilus influenzae*-CRM); PRP-T (conjugado del toxoide del polisacárido-tétanos b de *Haemophilus influenzae*); DT (toxoides de la difteria y el tétanos).

*Los datos mostrados son de los 94 niños que completaron la vacunación conjugada y se eligieron para evaluación (Véanse los métodos).

** En el momento de la primera dosis de la vacuna conjugada.

Reacciones adversas

Se les solicitó a los padres completar un breve cuestionario para anotar las reacciones locales en los sitios de inyección, temperaturas diarias, y otras posibles reacciones sistémicas que sucediesen durante las 72 horas siguientes a cada dosis de la vacunación DTP/conjugado. Estas observaciones se complementaron con entrevistas telefónicas realizadas por las enfermeras del estudio, y una revisión de las posibles reacciones adversas en el momento de cada visita programada al consultorio. La vigilancia activa de las reacciones adversas no se realizó después de la vacunación DT, a un mes de edad; sin embargo, se obtuvo información sobre posibles reacciones graves a esta vacunación en la visita del segundo mes, antes de comenzar con la vacunación DTP/conjugado.

Laboratorio

Se enviaron los viales codificados duplicados de suero congelado a la Universidad de Washington en St. Louis para medir concentraciones totales de anticuerpo anti-PRP, y a Connaught Laboratories, Inc, Swiftater, PA, para la medición de las concentraciones de anticuerpo ante los toxoides de difteria y tétanos. Todos los ensayos se realizaron sin conocimiento del estado de exposición previa a DT, o de la vacuna conjugada asignada.

Las concentraciones totales de anticuerpos anti-PRP se midieron mediante un ensayo de unión de radioantígeno RABA (Granoff *et al.*, J. Inf. Dis. 1986; 154: 257-264). La curva patrón para el RABA consistió en diluciones de la serie de suero de referencia de Hib, obtenido del Center for Biologic Evaluation and Research (CBER), U.S. Food and Drug Administration, Bethesda, MD. La concentración total de anticuerpo anti-PRP de este banco se estimó que era de 80 μ g/ml. Los ensayos individuales incluyeron series de suero de control representativos de un amplio intervalo de concentraciones de anticuerpo (Granoff *et al.*, J. Pediatr. 1992; 121: 187-194; Colmes *et al.*, J. Pediatr. 1991; 118:364-371).

Se midieron las concentraciones del anticuerpo de toxoide antitétanos y toxoide antidifteria en muestras de suero de aproximadamente un 90% de muestras de los sujetos, seleccionados basándose en la finalización del protocolo de recuerdo PRP antes de abril de 1993, y en la disponibilidad de cantidades suficientes de suero para los ensayos.

Las valoraciones de los anticuerpos del toxoide antitétanos se determinaron mediante ELISA. Brevemente, se incubaron placas de microensayo durante una noche a temperatura ambiente con toxoide del tétanos purificado en tampón

carbonato, pH 9,6. Las placas se lavaron, y se transfirieron muestras de 50 μ l de diluciones en series dobles de los sueros de ensayo y sueros control a las placas recubiertas. Después de la incubación durante 3 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron, y el anticuerpo unido se detectó usando IgG, IgA e IgM de cabra antihumano conjugadas a fosfatasa alcalina- (Kirkegaard and Perry Laboratory, Gaithersburg MD). Las concentraciones de anticuerpo anti-toxoide del tétanos se asignaron a los sueros ensayados, en unidades/ml, mediante comparación con la curva de valoración de la unión de anticuerpo de una serie de suero de referencia, preparado en Connaught Laboratory a partir de suero de adultos vacunados con toxoide del tétanos. A esta serie de suero se le asignó arbitrariamente una concentración de 1 unidad/ml de antitoxina.

Los anticuerpos neutralizantes antidifteria se midieron mediante un ensayo de inhibición micrometabólica (Miyamura *et al.*, J. Biol. Stand. 1974; 2:203-209; Keefenberg *et al.*, J. Biol. Stand. 1985; 13:229-234). Brevemente, se añadieron 50 μ l de diluciones en serie dobles de sueros de ensayo a pocillos de placas de cultivo de tejido de 96 pocillos de base plana (número de catálogo 25861, Corning Laboratory Sciences, Corning NY). Se añadió toxina de la difteria (25 μ l de una concentración 4 veces en exceso de la dosis citopática mínima) a todos los pocillos de muestra. Se añadieron células VERO (riñón de mono verde africano) (25 μ l de 150.00 células/ml), y se incluyó un indicador de pH en el medio de cultivo celular. Las células se incubaron a 37°C durante 7 días, tiempo durante el cual las células metabolizantes muestran una caída a pH < 7,20, mientras que se inhibe la actividad metabólica de las células intoxicadas con difteria y no tiene lugar un descenso de pH. Las valoraciones de anticuerpo se determinaron mediante la dilución más alta de suero, dando un pH < 7,20 después de siete días de incubación. Las concentraciones de anticuerpo antidifteria de los sueros de ensayo se asignaron en unidades/ml por comparación con la actividad antitoxina de las diluciones de un suero estándar estadounidense conocido (Lote A52, proporcionado por CBER, U.S. Food and Drug Administration, Bethesda, MD), ensayado en paralelo con las muestras de ensayo. Nótese que una unidad de anticuerpo de toxina antidifteria y una unidad de anticuerpo de toxoide antitétanos no son equivalentes en base a su peso o actividad. Por tanto, la magnitud de las concentraciones respectivas de anticuerpo no se puede comparar directamente.

Análisis estadísticos

Los datos de frecuencia se compararon usando el ensayo de Chi cuadrado o ensayo exacto de Fisher, cuando fue necesario para pequeñas frecuencias esperadas. Las concentraciones de anticuerpo se transformaron logarítmicamente, y la media geométrica de las concentraciones de anticuerpo se comparó mediante análisis de la varianza. Para estos cálculos, a las concentraciones de anticuerpo menores que el mínimo detectado en el ensayo se les asignaron valores del 50% del mínimo (por ejemplo, a concentraciones de anticuerpo anti-PRP < 0,07 μ g/ml, concentraciones de anticuerpo antitétanos < 0,01 unidades/ml, y concentraciones de anticuerpo antidifteria < 0,01 unidades/ml se les asignaron valores de 0,035 μ g/ml, 0,005 unidades/ml, y 0,005 unidades/ml, respectivamente. Las respuestas de anticuerpo conjugado ante las vacunaciones con DT/DTP de los niños en Minneapolis y St. Louis se combinaron, ya que no había diferencias estadísticas significativas en los resultados entre los dos sitios de estudio.

Resultados

Reacciones adversas

Las pautas de vacunación se toleraron bien. No hubo reacciones graves, incluyendo reacciones hipotensivas-hiporesponsivas, convulsiones, episodios de llanto prolongado, temperaturas > 39,9°C, en ninguno de los niños. En los cuatro grupos, estuvo presente una temperatura > 37,8°C en el 20% a 33% de los niños después de la primera dosis de DTP/conjugado, 23% a 29% después de la segunda dosis, y 21% a 35% después de la tercera dosis. Ninguna de las diferencias respectivas entre los grupos de vacunas fue significativa ($p > 0,10$).

Inmunogenicidad

Respuestas del anticuerpo anti-PRP ante la vacunación conjugada

La Tabla 2 resume el efecto de la exposición previa a la vacuna DT a un mes de edad en las respuestas de anticuerpo anti-PRP ante la vacuna de conjugado Hib administrada a los 2, 4 y 6 meses de edad. Antes de la primera dosis de la vacuna conjugada, no hubo diferencias significativas en la media geométrica de las concentraciones de anticuerpo anti-PRP de los cuatro grupos. Para los niños a los que se les administró PRP-T, la vacunación DT a un mes de edad aumentó la media geométrica de las respuestas del anticuerpo anti-PRP en 2 a 3 veces después de cada una de las tres dosis de vacuna conjugada comparada con las medias geométricas respectivas de las respuestas de los niños vacunados con PRP-T que no se expusieron previamente a DT. Para los niños a los que se les administró Hb0C, estuvo presente también un aumento de 2 a 3 veces en la respuesta del anticuerpo anti-PRP en el grupo expuesto previamente con DT comparado con aquel grupo no expuesto previamente, pero solo después de las dosis 1ª y 2ª conjugadas (Tabla 2).

Para ambos grupos de vacunas conjugadas, la proporción de niños que respondieron a la segunda dosis de la vacuna conjugada con > 1 μ g/ml de un anticuerpo anti-PRP fue mayor para los niños expuestos previamente con DT que para los niños no expuestos previamente (Hb0C: 38% frente al 4%, $p < 0,01$; PRP-T: 88% frente al 67%, $p = 0,10$). Las diferencias correspondientes no fueron significativamente diferentes después de una dosis de la vacuna conjugada (Hb0C: 0% frente al 0%; PRP-T: 20% frente al 4%, $p > 0,10$); o después de tres dosis (Hb0C: 86% frente al 88%; PRP-T: 96% frente al 96%, $p > 0,90$).

Tabla 2. Respuestas del anticuerpo anticapsulante a la vacuna del conjugado Hib administrada a los 2, 4 y 6 meses de edad en relación con la exposición previa a la vacuna DT a un mes

Concentración del anticuerpo anti-PRP (µg/ml)*					
Vacuna exposición previa a DT	Nº de pacientes	Antes de la vacuna conjugada	Después de la 1ª dosis	Después de la 2ª dosis	Después de la 3ª dosis
<u>HbOC</u>					
Expuesto previamente	21	0,17 (1,75)	0,16 ± (1,50)	0,73# (1,71)	5,70 (1,82)
No expuesto previamente	24	0,15 (1,69)	0,09 ± (1,46)	0,23 # (1,65)	4,50 (1,74)
<u>PRP-T</u>					
Expuesto previamente	25	0,16 (1,64)	0,37 ** (1,56)	4,12** (1,57)	13,6 ± (1,51)
No expuesto previamente	24	0,19 (1,68)	0,17** (1,58)	1,63** (1,58)	7,9 ± (1,51)

+ Todos los sujetos recibieron también vacuna DTP a los 2, 4 y 6 meses de edad. Para las abreviaturas de las vacunas, véase la leyenda de la Tabla 1

* Los valores mostrados son las medias geométricas. Los valores entre paréntesis son los antilogaritmos de 2. D.E. Multiplicar y dividir por estos valores da los límites superiores e inferiores, respectivamente, del intervalo de confianza del 95% de las medias geométricas.

± 0,05<p<0,10; comparación del grupo expuesto previamente frente al respectivo expuesto previamente

** p ≤ 0,01 después de la 1ª dosis y la 2ª dosis

p=0,003

ES 2 204 967 T5

Memoria de las respuestas de anticuerpo ante la vacunación de recuerdo PRP

El PRP no conjugado se administró a los 12 meses de edad a 74 de los 94 niños (79%) que completaron la vacunación conjugada. La Figura 1 resume la media geométrica respectiva de las concentraciones de anticuerpo \pm 2 DE (intervalo de confianza del 95%) en sueros obtenidos inmediatamente antes y 1 mes después de la inyección de recuerdo. Entre los niños vacunados con PRP-T, la media geométrica de la concentración de anticuerpo anti-PRP del grupo expuesto previamente a DT fue de 2,6 $\mu\text{g/ml}$ inmediatamente antes al de refuerzo PRP frente a 1,6 $\mu\text{g/ml}$ en los niños correspondientes que no recibieron DT ($p=0,11$). Un mes después del recuerdo PRP, la media geométrica de la concentración de anticuerpo fue de 26,4 $\mu\text{g/ml}$ en el grupo expuesto previamente a DT frente a 8,6 $\mu\text{g/ml}$ en niños que no recibieron DT ($p=0,01$). En los niños a los que se les administró Hb0C, no hubo diferencias significativas en la media geométrica respectiva de las concentraciones anti-PRP entre los expuestos previamente a DT y los no expuestos previamente antes del recuerdo PRP (1,2 frente a 1,1 $\mu\text{g/ml}$), o 1 mes después de PRP (6,0 frente a 8,8 $\mu\text{g/ml}$, $p=0,34$).

Respuestas de anticuerpos antidifteria y antitétanos

Con una excepción, no hubo diferencias significativas a los dos meses de edad en la media geométrica respectiva de las concentraciones de anticuerpo anti D o anti T de los niños vacunados con DT al mes de edad y aquellos que no fueron vacunados con DT (Tablas 3 y 4). La excepción fue que los niños distribuidos al azar para recibir PRP-T en el grupo previamente expuesto a DT tuvieron una media geométrica 2 veces más alta de concentración de anticuerpo anti T que los correspondientes al grupo no expuesto previamente (0,06 frente a 0,03 unidades/ml, $p=0,02$). Este resultado puede haber sucedido por casualidad, ya que se observó la tendencia opuesta en los correspondientes grupos distribuidos al azar para recibir Hb0C (0,05 frente a 0,07 unidades/ml, $p>0,10$, Tabla 3).

La exposición previa a DT a 1 mes potenció las respuestas del anticuerpo anti D para las siguientes inyecciones de DTP y conjugado administradas a los 2, 4 y 6 meses. Después de la primera vacunación con DTP/conjugado, los infantes expuestos previamente tuvieron entre 1,5 a 2 veces más alta la media geométrica de las concentraciones de anticuerpo anti D y anti T que la media geométrica respectiva de los niños no expuestos previamente ($p<0,60$); después de la segunda vacunación, las medias geométricas respectivas de los niños expuestos previamente fueron de 3 a 5 veces más altas que aquellas de los niños no expuestos previamente ($p<0,001$). Después de la tercera vacunación DTP/conjugado, parece que hubo una interacción entre la vacuna conjugada específica y la respuesta de anticuerpos anti D o anti T respectiva. Los niños expuestos previamente a DT vacunados con PRP-T/DP tuvieron concentraciones de anticuerpo anti T 2 veces mayores que los niños no expuestos previamente ($p<0,001$), pero las respuestas respectivas anti D no fueron significativamente diferentes ($p>0,20$). En contraste, los niños expuestos previamente vacunados con Hb0C/DTP tuvieron unas concentraciones de anticuerpo anti D 2 veces mayores que los niños no expuestos previamente ($p<0,01$), pero las respuestas respectivas anti T no fueron significativamente diferentes ($p>0,24$).

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 3. Respuestas de anticuerpos anti-toxoide del tétanos a la vacunación DTP/conjugado Hib a los 2, 4 y 6 meses de edad en relación con la exposición previa a la vacuna DT a un mes

Concentración del anticuerpo anti toxoide del tétanos (unidades/ml) *					
Vacuna exposición previa a DT	Nº de pacientes	Antes de la vacuna DTP #	Después de la dosis 1	Después de la dosis 2	Después de la dosis 3
HbOC					
Expuesto previamente	21	0,05 (1,49)	0,05 ++ (1,43)	0,15+ (1,32)	0,29 (1,29)
No expuesto previamente	21	0,07 (1,49)	0,03 ++ (1,49)	0,05 + (1,29)	0,23 (1,28)
PRP-T					
Expuesto previamente	24	0,06 ** (1,38)	0,05 ± (1,29)	0,15 ± (1,36)	0,34 ± (1,26)
No expuesto previamente	21	0,03 ** (1,43)	0,03 ± (1,36)	0,06 ± (1,39)	0,18 ± (1,28)

+ Todos los sujetos recibieron también vacuna DTP a los 2, 4 y 6 meses de edad. Para las abreviaturas de las vacunas, véase la leyenda de la Tabla 1

* Los valores mostrados son las medias geométricas. Los valores entre paréntesis son los antilogaritmos de 2. D.E. Multiplicar y dividir por estos valores da los límites superiores e inferiores, respectivamente, del intervalo de confianza del 95% de las medias geométricas. Los datos que se muestran son de una muestra del 93% de los sujetos (véase el texto)

1 mes después de la vacunación DT en los grupos expuestos previamente

++p < 0,06

± p < 0,001; comparación del grupo expuesto previamente frente al respectivo no expuesto previamente

** p = 0,02

Tabla 4. Respuestas de anticuerpos anti-toxoide de difteria a la vacunación DTP/conjugado Hib a los 2, 4 y 6 meses de edad en relación con la exposición previa a la vacuna DT a un mes

Concentración del anticuerpo anti-PRP (µg/ml) *					
Vacuna exposición previa a DT	Nº de pacientes	Antes de la vacuna DTP +	Después de la dosis 1	Después de la dosis 2	Después de la dosis 3
<u>Hb0C</u>					
Expuesto previamente	21	0,07 (1,82)	0,05 ** (1,65)	0,23 # (1,57)	0,89 ‡ (1,56)
No expuesto previamente	21	0,11 (1,82)	0,02 ** (1,62)	0,04 # (1,54)	0,35 (1,54)
<u>PRP-T</u>					
Expuesto previamente	24	0,15 (1,78)	0,06 # (1,44)	0,19 # (1,56)	0,70 ‡ (1,54)
No expuesto previamente	21	0,09 (1,91)	0,03 # (1,51)	0,06 # (1,58)	0,47 (1,58)

+ Todos los sujetos recibieron también vacuna DTP a los 2, 4 y 6 meses de edad. Para las abreviaturas de las vacunas, véase la leyenda de la Tabla 1

* Los valores mostrados son las medias geométricas. Los valores entre paréntesis son los antilogaritmos de 2. D.E. Multiplicar y dividir por estos valores da los límites superiores e inferiores, respectivamente, del intervalo de confianza del 95% de las medias geométricas. Los datos que se muestran son de una muestra del 92% de los sujetos (véase el texto).

+ 1 mes después de la vacunación DT en los grupos expuestos previamente

**p< 0,06

p<0,001 comparación de los expuestos previamente s frente al grupo respectivo no expuesto previamente

‡ p<0,01; comparación de los expuestos previamente frente al grupo respectivo no expuesto previamente

Ejemplo 2

Selección del tamaño de los oligómeros inmunogénicos

Como ejemplo, se describe la selección de los oligómeros inmunogénicos de *Haemophilus influenzae* tipo B. Después de la hidrólisis ácida controlada a temperatura elevada, las preparaciones de oligosacáridos obtenidas comprenden oligómeros de longitud de cadena variable, desde oligómeros sencillos hasta de cadena relativamente larga. Las figuras 2 y 3 (carril B) ilustran la heterogeneidad de dicho hidrolizado. En el caso ilustrado, se calculó que aproximadamente la mitad de las especies de oligómeros, en relación molar, tienen una cadena de azúcar de menos de 5 residuos de azúcar. Cuando tal hidrolizado se conjuga con una proteína transportadora, por ejemplo CRM-197, producirían un producto de vacuna que sería probablemente poco inmunogénico.

Para eliminar las especies de cadena corta, no deseadas, los inventores han desarrollado un procedimiento cromatográfico que permite exquisitamente la separación de oligómeros de azúcar de cadena larga de las especies de cadena corta. El procedimiento desarrollado se basa en el uso de una matriz cromatográfica específica, Q-Sepharose Fast Flow, y concentraciones iónicas definidas de sal e ión hidrógeno. La concentración de sal requerida para eliminar las especies de bajo peso molecular puede estar entre 0,05 M y 0,150 M. Preferiblemente, se usa el cloruro de sodio. La concentración de ión hidrógeno debería estar entre 10^{-5} y 10^{-8} M, y se usaron preferiblemente sales acetato. Las figuras 3 y 4 (carril F) muestran el perfil de las especies de bajo peso molecular, que son poco inmunogénicas.

Los oligosacáridos para usar en la preparación de la vacuna se eluyen con una concentración de sal entre 0,25 M y 1,0 M, preferiblemente cloruro de sodio. El perfil cromatográfico de estas especies de alto peso molecular, usadas para la preparación de la vacuna, se ilustran en la figura 5. Para reforzar adicionalmente que este procedimiento cromatográfico puede proporcionar un producto de vacuna totalmente definido se han analizado tres preparaciones diferentes, y estas se muestran en la figura 3, carriles C, D y E.

Usando análisis de espectroscopía de masas, se ha establecido que este procedimiento además elimina de hecho las especies de bajo peso molecular, y estas tienen la longitud de cadena esperada, como se muestra por los análisis de espectroscopía de masas reseñado en la Tabla 5. Este procedimiento de fraccionamiento permite el fraccionamiento y la selección específica de oligosacáridos de entre 1 a 60 mg/ml de soporte matriz.

TABLA 5

Datos de EM por electropulverización			
Muestra	PM ISE	PM teórico	Caracterización
Pico 3	1122	1122 (inc Na)	DP3
Pico 4	1490	1490 (inc Na)	DP4
Pico 5	1858	1858 (inc Na)	DP5

Las especies de oligosacárido seleccionadas se pueden conjugar a la proteína transportadora CRM-197 usando la química enumerada a continuación (Costantino *et al.*, Vaccine 10:691-698)

a) Aminación reductora de los oligosacáridos seleccionados introduciendo un grupo amino primario en su extremo reductor;

b) Transformación de los amino-oligosacáridos en un éster activo mediante reacción con diéster de N-hidroxisuccinimida de ácido atípico;

c) Acoplamiento de los oligosacáridos activados a CRM-197; y finalmente la purificación del conjugado para la fabricación de la vacuna.

El procedimiento aquí descrito ha sido aplicado exitosamente a oligosacáridos de meningococo C y puede aplicarse claramente a todos los polímeros de azúcar que contienen un resto de carga negativa, como los meningococos A y B al igual que otros. La figura 6 muestra la naturaleza poco inmunogénica de los oligosacáridos Men C que tienen un grado de polimerización menor de cuatro.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna combinada para la meningitis que comprende conjugados de oligosacáridos Hib y Men C.

2. Una vacuna según la reivindicación 1, que además comprende un conjugado de oligosacáridos Men B.

3. Una vacuna según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que los oligosacáridos se seleccionan por tamaño.

4. Una vacuna según la reivindicación 3, en la que los oligosacáridos se seleccionan por tamaño para excluir los oligómeros de cadena corta que tienen un grado de polimerización menor de cuatro.

5. Una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los conjugados de oligosacáridos MenC y/o Hib está/están en forma líquida tamponada.

6. Una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los conjugados de oligosacárido MenC y/o Hib está/están en forma liofilizada.

7. Una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los conjugados de oligosacáridos MenC y/o Hib está/están conjugados a un toxoide del tétanos, toxoide de la difteria, o a una proteína de membrana externa de *Neisseria meningitidis*.

8. Una vacuna según la reivindicación 7, en la que los conjugados de oligosacáridos Men C y/o Hib está/están conjugados a CRM-197.

9. Una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un coadyuvante.

10. Una vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso en medicina.

11. El uso de conjugados de oligosacáridos Hib y MenC en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de la meningitis.

12. El uso de la reivindicación 11, en el que la administración del medicamento se usa después de una etapa de exposición previa al transportador.

13. El uso de la reivindicación 11, en el que la exposición previa al transportador se consigue mediante la administración de una vacuna DTP.

FIG 1

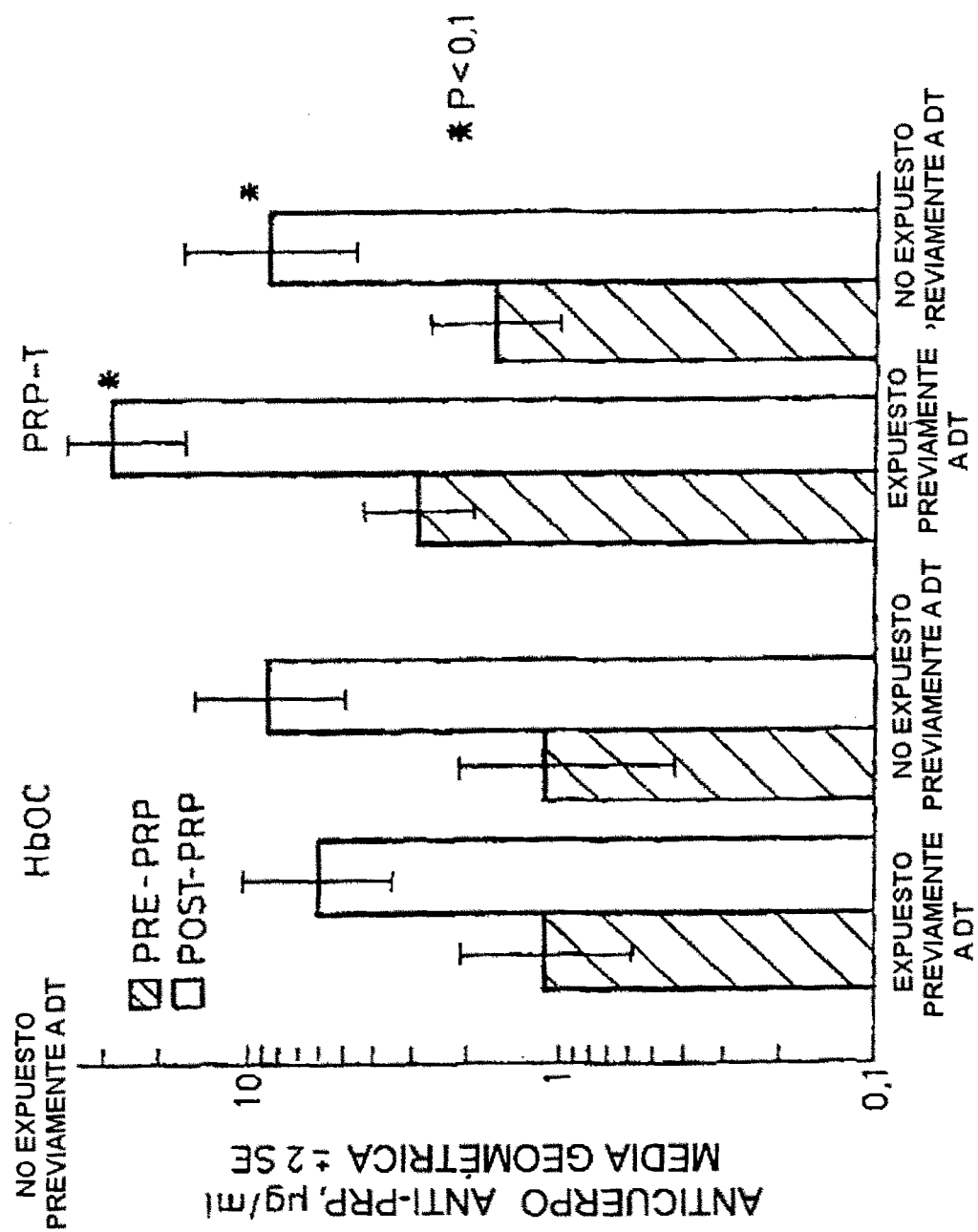


FIG. 2

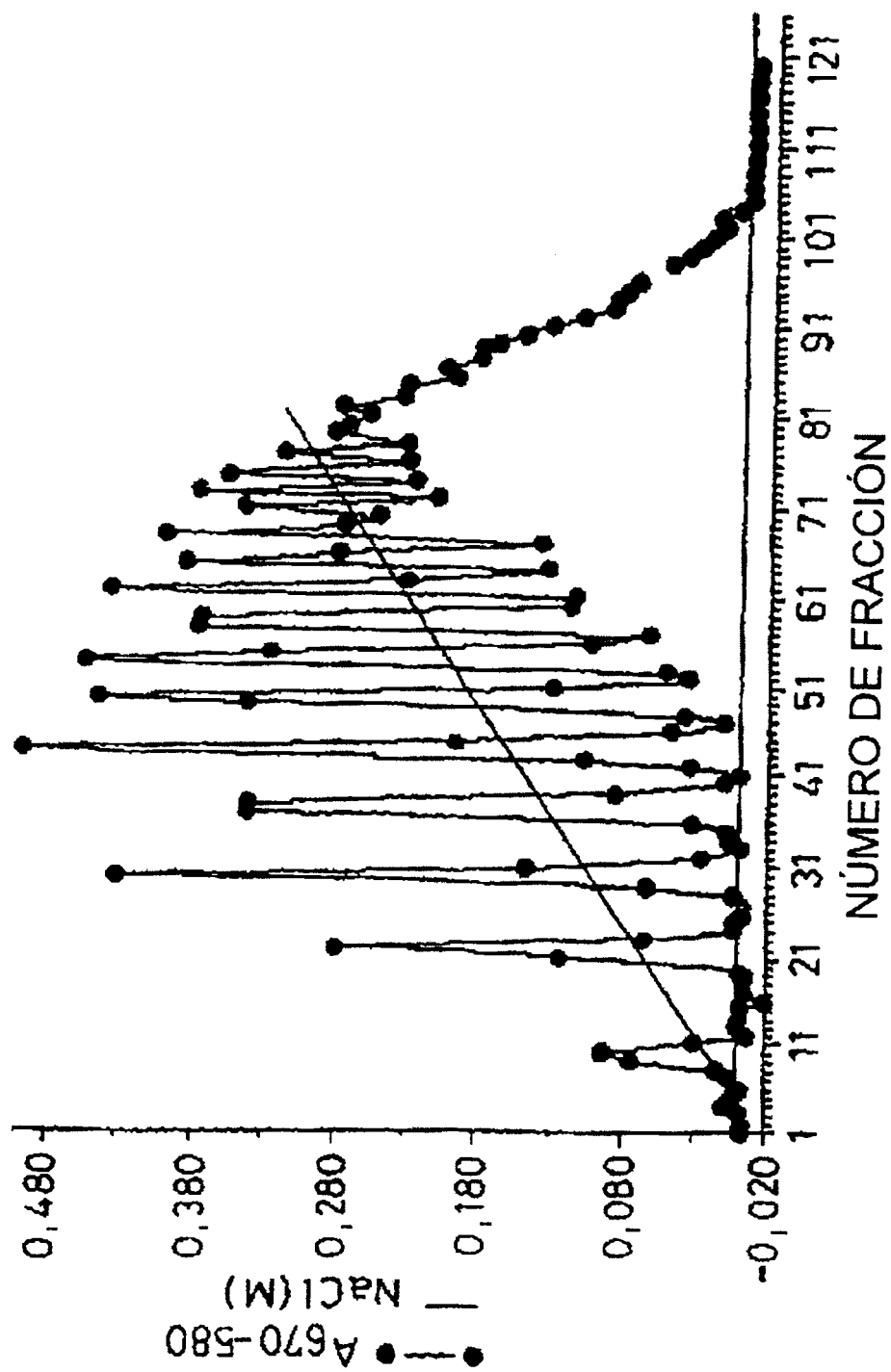
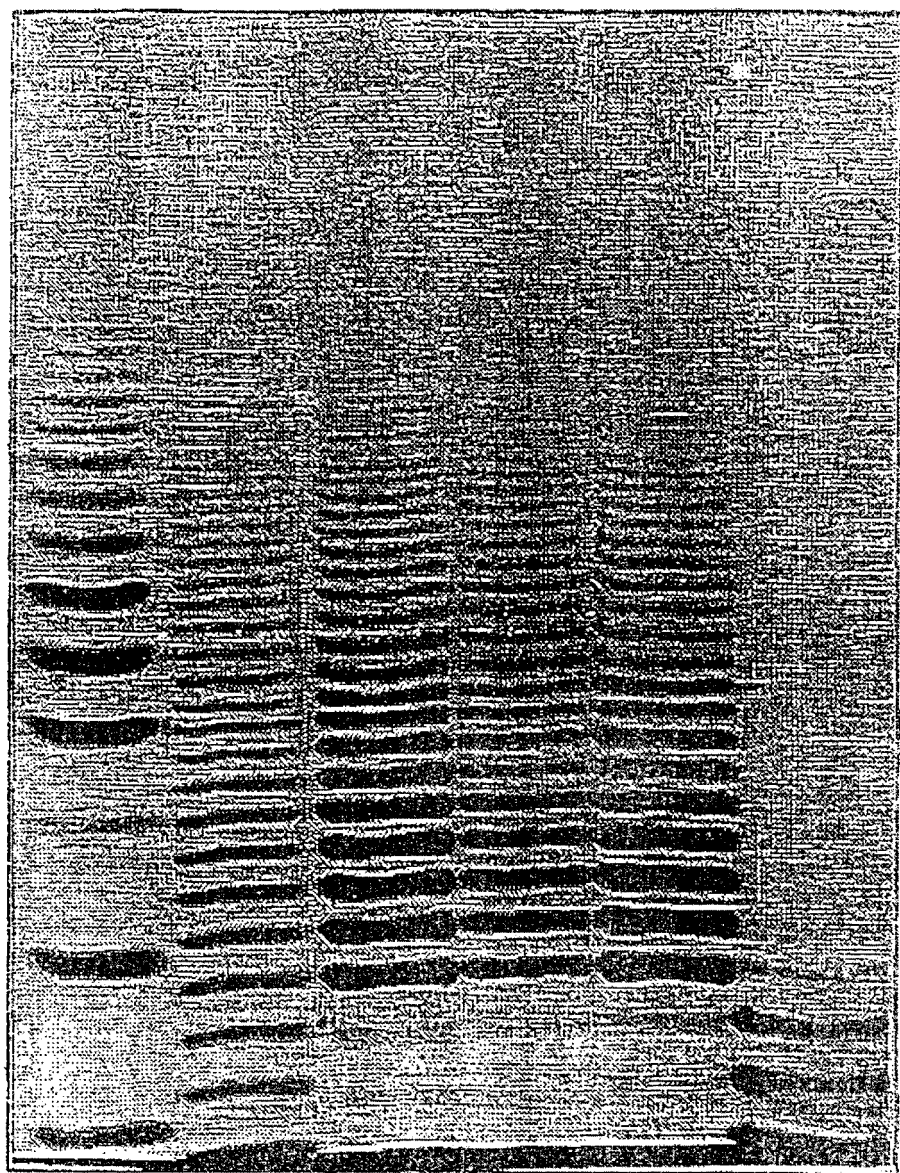


FIG. 3



A

B

C

D

E

F

A- PATRÓN: B- HIDROLISADO ÁCIDO:
OLIGOSACÁRIDOS C-, D-, E- PARA LA PREPARACIÓN DE LA VACUNA:
F- OLIGÓMEROS DE BAJO PESO MOLECULAR DESCARTADOS.

FIG. 4

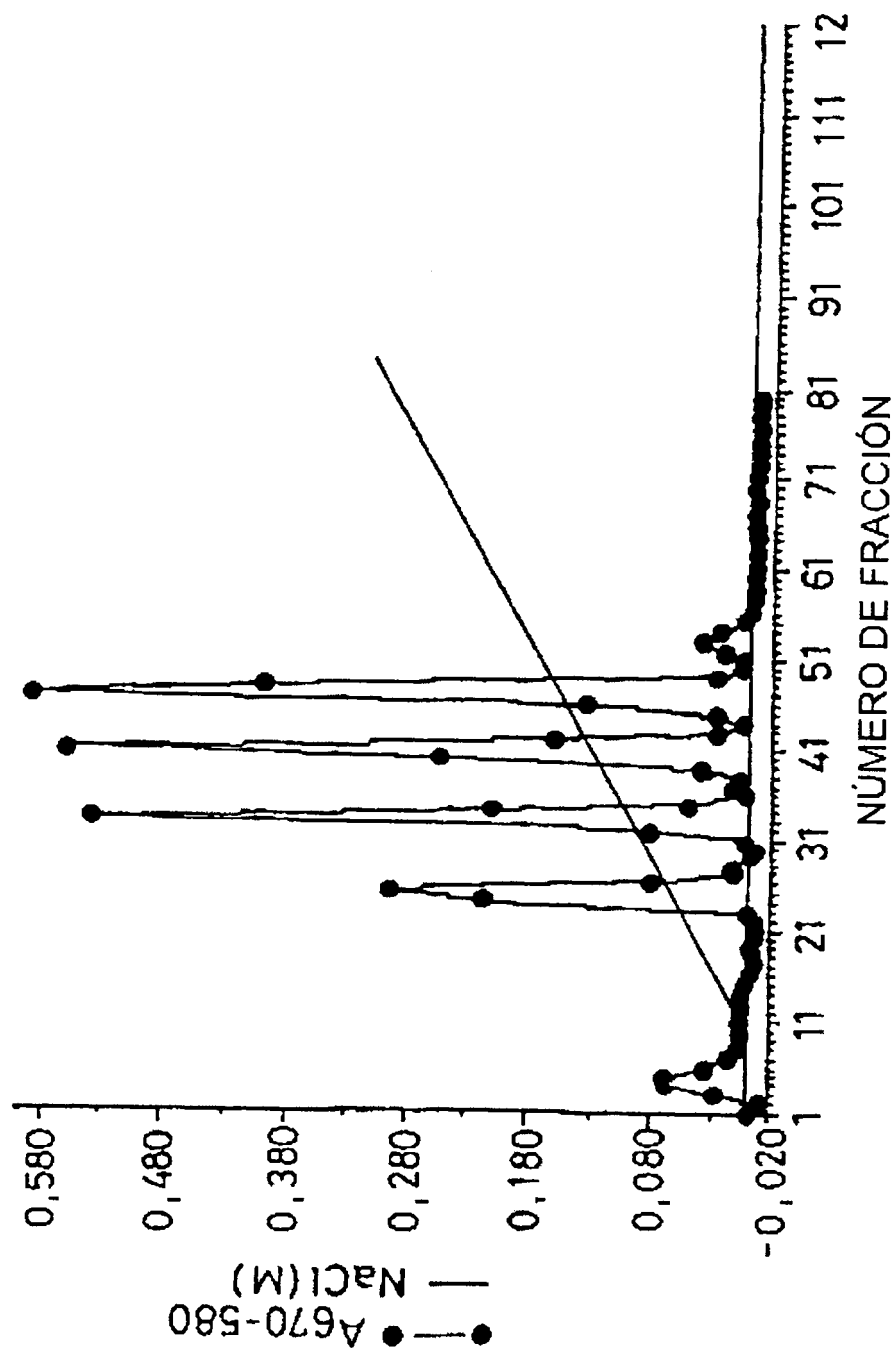


FIG. 5

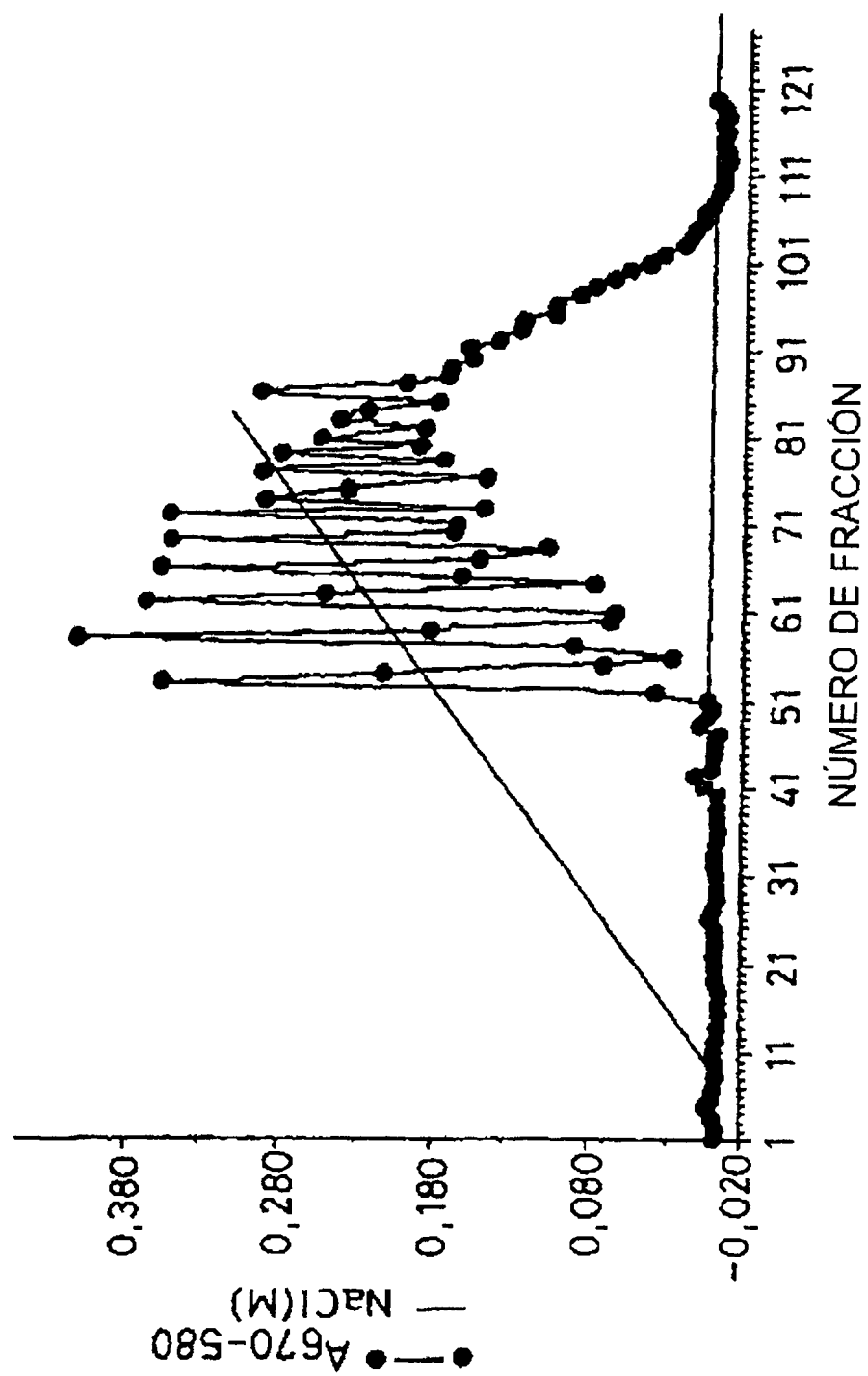


FIG. 6

