

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 153**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2010 E 10712546 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2424562**

54 Título: **Vacuna neumocócica y usos de la misma**

30 Prioridad:

30.04.2009 US 174068 P

31.08.2009 US 238313 P

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

26.11.2015

73 Titular/es:

COLEY PHARMACEUTICAL GROUP, INC.

(100.0%)

235 East 42nd Street

New York, N.Y. 10017, US

72 Inventor/es:

DAVIS, HEATHER LYNN;

KRIEG, ARTHUR MERTZ;

LOHSE, NICOLAI;

OSTERGAARD, LARS;

SCHONHEYDER, HENRIK CARL y

SOGAARD, OLE SCHMELTZ

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 552 153 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).

DESCRIPCION

Vacuna neumocócica y usos de la misma

Campo de la invención

5 La invención se refiere a la vacunación de sujetos, en particular sujetos inmunodeprimidos, contra infecciones neumocócicas usando vacunas neumocócicas novedosas.

Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades neumocócicas son un problema de salud pública grave en todo el mundo. Las infecciones causadas por neumococos son una causa principal de la morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Neumonía, bacteremias febriles y meningitis son las manifestaciones más comunes de enfermedad invasiva neumocócica, mientras que la diseminación bacteriana dentro del tracto respiratorio puede dar como resultado infección del oído medio, sinusitis o bronquitis recurrente. Comparadas con la enfermedad invasiva, las manifestaciones no invasivas son habitualmente menos graves, pero considerablemente más comunes.

15 A pesar de la importancia de la enfermedad neumocócica, existe una escasez de información sobre las consecuencias de la enfermedad, en particular de los países en desarrollo. Esto es en parte debido al problema inherente de obtener un diagnóstico etiológico en casos de neumonía. Sin embargo, en base a los datos disponibles, las infecciones respiratorias agudas matan una cantidad estimada en 2,6 millones de niños por debajo de los cinco años de edad anualmente. El neumococo causa más de 1 millón de estas muertes, la mayor parte de las cuales tienen lugar en países en desarrollo, donde el neumococo es probablemente el patógeno más importante de la infancia temprana. En Europa y en los Estados Unidos, la neumonía neumocócica es la neumonía bacteriana adquirida por una comunidad más común, se ha estimado que afecta aproximadamente a 100 de cada 100.000 adultos cada año. Las correspondientes figuras para la bacteremia febril y la meningitis son 15–19 por 100.000 y 1–2 por 100.000, respectivamente. El riesgo para una o más de estas manifestaciones es mucho mayor en bebés y personas de edad avanzada, así como en personas inmunodeprimidas de cualquier edad. Incluso en regiones económicamente desarrolladas, la enfermedad neumocócica invasiva acarrea alta mortalidad; para adultos con 20 neumonía neumocócica la tasa de mortalidad es en promedio del 10 %–20 %, mientras que puede superar el 50 % en los grupos de alto riesgo. La neumonía es con mucho la causa más común de muerte neumocócica en todo el mundo.

30 El agente etiológico de enfermedades neumocócicas, *Streptococcus pneumoniae* (el neumococo) es un coco Gram-positivo encapsulado, rodeado por una cápsula de polisacárido. Las diferencias en la composición de esta cápsula permiten diferenciación serológica entre aproximadamente 90 tipos capsulares, algunos de los cuales están frecuentemente asociados con la enfermedad neumocócica, otros raramente. Las infecciones neumocócicas invasivas incluyen neumonía, meningitis y bacteremias febriles; entre las manifestaciones no invasivas están la otitis media, la sinusitis y la bronquitis.

35 La resistencia neumocócica a antimicrobianos esenciales tales como las penicilinas, las cefalosporinas y los macrólidos es un problema mundial que se incrementa grave y rápidamente.

Las condiciones asociadas con riesgo incrementado de enfermedad neumocócica grave incluyen extremos de edad (bebés, personas mayores) y estar inmunodeprimido por cualquier razón, incluyendo pero sin limitación: infección por el VIH, otras infecciones víricas crónicas, anemia falciforme, diabetes, cáncer y tratamiento del cáncer, tabaquismo, fallos orgánicos crónicos, trasplante de órganos y terapia inmunosupresora.

40 El reciente desarrollo de resistencia microbiana amplia a antibióticos esenciales y el creciente número de personas inmunodeprimidas subrayan la necesidad urgente de vacunas neumocócicas más eficientes.

45 Algunas de las deficiencias de la vacunación actual incluyen: necesidad de varios refuerzos para alcanzar la protección, retraso en el incremento de anticuerpos protectores, prevalencia de personas que no responden a la vacuna (esto es en particular un problema para individuos inmunodeprimidos), coste de producción de antígenos y vacunas que es una limitación muy significativa en el desarrollo de nuevas vacunas neumocócicas conjugadas, anticuerpos pobremente protectores con afinidad baja, valoraciones de anticuerpos que disminuyen a lo largo del tiempo.

Un objeto de la nueva vacuna neumocócica de la invención es superar al menos parcialmente algunas de estas deficiencias. En particular con miras a vacunar sujetos inmunodeprimidos contra infecciones neumocócicas.

50 Cordonnier y col. (Clinical Infectious Diseases 2009; 48:1392-401) divulga la vacunación de pacientes inmunodeprimidos (después de trasplante de células madre alogénicas) contra enfermedad invasiva por neumococos usando un coadyuvante de vacuna antineumocócica conjugada (PCV) 7-valente con alumbre (Pvnaar®), y para optimizar su eficacia en comparación con la vacunación temprana (3 meses después del trasplante) con una vacunación tardía (9 meses después del trasplante).

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a nuevas vacunas neumocócicas para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades provocadas por infección por *S. pneumoniae* en un sujeto inmunodeprimido, sujeto inmunodeprimido que padece de infección por VIH o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y se encuentra en terapia antirretroviral altamente activa.

Agonista de receptor similar a Toll 9 (agonista de TLR-9) de la invención

En una realización de la presente invención, un agonista de TLR-9 para su uso en la presente invención es un oligonucleótido CpG. Un oligonucleótido CpG, tal como se usa en el presente documento, hace referencia a un oligodesoxinucleótido CpG inmunoestimulante (CpG ODN) y de acuerdo con ello estos términos se usan intercambiamente a menos que se indique lo contrario. Los oligonucleótidos CpG inmunoestimulantes contienen uno o más motivos de CpG inmunoestimulantes que son dinucleótidos citosina-guanina no metilados, opcionalmente dentro de ciertos contextos de base preferidos. El estado de metilación del motivo inmunoestimulante CpG se refiere generalmente al residuo de citosina del dinucleótido. Un oligonucleótido inmunoestimulante que contiene al menos un dinucleótido CpG no metilado es un oligonucleótido que contiene una citosina no metilada 5' unida por un enlace de fosfato a una guanina 3' y que activa el sistema inmunitario por unión al receptor similar a Toll 9 (TLR-9). En otra realización, el oligonucleótido inmunoestimulante puede contener uno o más dinucleótidos CpG metilados, que activarán el sistema inmunitario a través de TLR9 pero no tan fuertemente como si el/los motivo(s) de CpG estuviese(n) no metilados. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG CpG pueden comprender uno o más palíndromos que a su vez pueden abarcar el dinucleótido CpG. Los oligonucleótidos CpG se han descrito en un número de patentes expedidas, solicitudes de patentes publicadas y otras publicaciones, incluyendo las Patentes de los Estados Unidos N.º: 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116 y 6.339.068.

Se han identificado diferentes clases de oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG. Estos se denominan clase A, B, C y P y se describen en mayor detalle más adelante.

Cualquiera de las clases puede someterse a una modificación E que mejore su potencia. Una modificación E puede ser una sustitución de halógeno para el nucleótido 5' terminal; ejemplos de tales sustituciones incluyen pero no se limitan a sustituciones de bromo-uridina o de yodo-uridina. Una modificación E puede incluir también una sustitución de etil-uridina para el nucleótido 5' terminal.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG de "clase A" se caracterizan funcionalmente por la capacidad para inducir niveles altos de interferón-alfa (IFN- α) desde células dendríticas plasmacitoides (pDC) e inducir activación celular de NK mientras que tienen efectos mínimos en la activación de células B. Estructuralmente, esta clase típicamente ha estabilizado secuencias de poli-G en los extremos 5' y 3'. Tiene además una secuencia que contiene dinucleótido CpG fosfodiéster palindrómico de al menos 6 nucleótidos, por ejemplo, pero no necesariamente, contiene uno de los siguientes palíndromos hexámeros: GACGTC, AGCGCT, o AACGTT descritos por Yamamoto y colegas. Yamamoto S y col., J. Immunol 148: 4072-6 (1992). Los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG de clase A y las secuencias ejemplares de esta clase se han descrito en la solicitud de patente no provisional de los Estados Unidos N.º: 09/672.126 y en la solicitud de PCT publicada PCT/USOO/26527 (documento WO 01/22990), ambas presentadas el 27 de septiembre del 2000.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG de "clase B" se caracterizan funcionalmente por la capacidad de activar células B y pDC salvo que son relativamente débiles en inducir activación de IFN- α y de células NK. Estructuralmente, esta clase típicamente puede estar totalmente estabilizada con enlaces fosforotioato, pero puede tener también uno o más enlaces fosfodiéster, preferentemente entre la citosina y la guanina del/de los motivo(s) de CpG, en cuyo caso la molécula se denomina semiblanda.

Las secuencias de oligonucleótido CpG de clase B se divulgan en las solicitudes de patente PCT PCT/US95/01570 y PCT/US97/19791, y en los documentos USP 6.194.388, 6.207.646, 6.214.806, 6.218.371, 6.239.116 y 6.339.068.

El oligonucleótido CpG de "clase B" de la invención tiene la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

5' TCGTCGTTTTTCGGTCTTTT 3' (SEC ID N.º: 3) o

5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (SEC ID N.º: 4) o

5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEC ID N.º: 5) o

5' TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEC ID N.º: 6) o

5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3' (SEC ID N.º: 7).

En cualquiera de estas secuencias, todos los enlaces pueden ser enlaces fosforotioato. En otra realización, en cualquiera de estas secuencias, uno o más de los enlaces pueden ser fosfodiéster, preferentemente entre la "C" y la "G" del motivo CpG formando un oligonucleótido CpG semiblando. En cualquiera de estas secuencias, una etil-uridina o un halógeno puede sustituirse por la T 5'; ejemplos de sustituciones de halógenos incluyen, pero sin

limitación, sustituciones bromo-uridina o yodo-uridina.

Algunos ejemplos no limitantes de oligonucleótidos de clase B incluyen:

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*G*C*T*T*T 3' (SEC ID N.º: 8) o

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T 3' (SEC ID N.º: 9) o

5 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEC ID N.º: 10) o

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEC ID N.º: 11) o

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*A 3' (SEC ID N.º: 12).

en las que * se refiere a un enlace fosforotioato.

10 La "clase C" de oligonucleótidos inmunoestimulantes de CpG se caracteriza funcionalmente por la capacidad para activar células B y células NK e inducir IFN- α . Estructuralmente, esta clase típicamente incluye una región con uno o más motivos de CpG inmunoestimulantes de tipo clase B y un palíndromo rico en GC o una región cercana a palíndromo que permite a las moléculas formar estructuras de tipo secundario (por ejemplo, tallo-lazo) o terciario (por ejemplo, dímero). Algunos de estos oligonucleótidos tienen tanto una secuencia CpG "estimuladora" tradicional como un motivo "rico en GC" o "neutralizador de células B". Estos oligonucleótidos de motivo de combinación tienen efectos inmunoestimulantes que caen en algún lugar entre los efectos asociados con los oligonucleótidos CpG de clase B tradicionales (es decir, fuerte inducción de activación de células B y activación de células dendríticas (DC)) y los efectos asociados con ODN CpG de clase A (es decir, fuerte inducción de IFN- α y activación de células NK pero inducción de células B y activación de DC relativamente pobre). Krieg AM y col. (1995) Nature 374: 546-9; Ballas ZK y col. (1996) J Immunol 157: 1840-5; Yamamoto S y col. (1992) J. Immunol. 148: 4072-6).

20 La C clase de oligonucleótidos estimuladores inmunitarios de motivo de combinación puede tener bien armazones completamente estabilizados (por ejemplo, todos fosforotioato), quiméricos (región central fosfodiéster), o semiblandos (por ejemplo, fosfodiéster dentro del motivo CpG). Esta clase se ha descrito en la solicitud de patente de los EE.UU. 10/224.523 presentada el 19 de agosto de 2002.

25 Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de CpG de "clase P" se han descrito en el documento WO2007/095316 y se caracterizan por el hecho de que contienen regiones que forman dúplex tales como, por ejemplo, palíndromos perfectos o imperfectos en o cerca de ambos extremos 5' y 3', dando ellos el potencial para formar estructuras de ordenación más alta tales como concatémicos. Estos oligonucleótidos denominados oligonucleótidos de clase P tienen la capacidad en algunos casos de inducir niveles muy altos de secreción de IFN- α que la clase C. Los oligonucleótidos de clase P tienen la capacidad de autoensamblarse espontáneamente en concatémicos bien in vitro o bien in vivo. Sin comprometerse con ninguna teoría en particular para el procedimiento de acción de estas moléculas, una hipótesis potencial es que esta propiedad dota a los oligonucleótidos de clase P con la capacidad de reticular TLR9 más altamente dentro de ciertas células inmunitarias, induciendo un patrón definido de activación inmunitaria comparada con las clases previamente descritas de oligonucleótidos CpG.

35 En una realización, todos los enlaces internucleotídicos de los oligonucleótidos CpG revelados en el presente documento son enlaces fosfodiéster (oligonucleótidos "blandos", como se describen en la solicitud PCT WO2007/026190). En una realización, los oligonucleótidos CpG de la invención se vuelven resistentes a degradación (por ejemplo, se estabilizan). Un "oligonucleótido estabilizado" hace referencia a un oligonucleótido que es relativamente resistente a degradación *in vivo* (por ejemplo, por medio de una exonucleasa o endonucleasa). La estabilización de ácidos nucleicos puede estar acomplejada por medio de modificaciones de estructura. Los oligonucleótidos que tienen enlaces fosforotioato proporcionan actividad máxima y protegen el oligonucleótido de degradación por exonucleasas y endonucleasas intracelulares.

45 Los oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden tener un armazón quimérico, que tiene combinaciones de enlaces fosfodiéster y fosforotioatos. Para los propósitos de la presente invención, un armazón quimérico hace referencia a un armazón parcialmente estabilizado, en el que al menos un enlace internucleotídico es fosfodiéster o similar a fosfodiéster y en el que al menos un enlace internucleotídico es un enlace internucleotídico estabilizado, en el que el al menos un enlace fosfodiéster o similar a fosfodiéster y al menos un enlace estabilizado son diferentes. Cuando el enlace fosfodiéster está preferentemente localizado dentro del motivo CpG tales moléculas se llaman "semiblandas" como se describe en la solicitud PCT WO2007/026190.

50 Otros oligonucleótidos modificados incluyen combinaciones de enlaces fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato y/o p-etoxi.

Puesto que se ha comunicado que los enlaces boranofosfonato se estabilizan de forma similar a los enlaces fosfodiéster, para propósitos de la naturaleza quimérica del armazón, los enlaces boranofosfonato pueden clasificarse bien como similares a fosfodiéster o bien como estabilizados, dependiendo del contexto. Por ejemplo, un armazón quimérico de acuerdo con la presente invención podría, en algunas realizaciones, incluir al menos un

enlace fosfodiéster (fosfodiéster o similar a fosfodiéster) y al menos un enlace boranofosfonato (estabilizado). En otras realizaciones, un armazón quimérico de acuerdo con la presente invención podría incluir enlaces boranofosfonato (fosfodiéster o similar a fosfodiéster) y fosforotioato (estabilizados). Un "enlace internucleotídico estabilizado" significará un enlace internucleotídico que es relativamente resistente a la degradación in vivo (por ejemplo por medio de una exonucleasa o endonucleasa), comparado con un enlace internucleotídico fosfodiéster. Preferentemente los enlaces internucleotídicos estabilizados incluyen, sin limitación, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato y metilfosforotioato. Otros enlaces internucleotídicos estabilizados incluyen, sin limitación, péptido, alquilo, defosfo y otros como se han descrito anteriormente.

Los armazones modificados tales como fosforotioatos pueden sintetizarse usando técnicas automatizadas usando bien productos químicos de fosforamidoato o bien de H-fosfonato. Los aril- y alquilfosfonatos puede elaborarse, por ejemplo, como se describe en la patente de los EE.UU. N.º 4.469.863; y los alquilfosfotriésteres (en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado como se describe en la patente de los EE.UU. 5.023.243 y en la patente europea N.º 092.574) se pueden preparar por síntesis en fase sólida automatizada usando reactivos comercialmente disponibles. Se han descrito procedimientos para hacer otras modificaciones y sustituciones en la estructura del ADN. Uhlmann E y col. (1990) Chem Rev 90:544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1: 165. Los procedimientos de preparación de oligonucleótidos quiméricos son también conocidos. Por ejemplo las patentes emitidas por Uhlmann y col. han descrito tales técnicas.

El ODN modificado de armazón mixto puede sintetizarse como se describe en la solicitud PCT WO2007/026190.

Los oligonucleótidos de la invención pueden también incluir otras modificaciones. Estas incluyen análogos de ADN no iónico, tales como alquil- y arilfosfatos (en los que el oxígeno de fosfonato cargado está reemplazado por un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y alquilfosfotriésteres, en los que está alquilado el resto de oxígeno cargado. Los ácidos nucleicos que contienen diol, tales como tetraetilenoglicol o hexaetilenoglicol, en cualquiera de sus extremos o en ambos extremos han demostrado también ser sustancialmente resistentes a degradación por nucleasa.

El tamaño del oligonucleótido CpG (es decir, el número de residuos nucleotídicos a lo largo de la longitud del oligonucleótido) pueden contribuir también a la actividad estimuladora del oligonucleótido. Para facilitar la captación dentro de las células, el oligonucleótido CpG de la invención tiene preferentemente una longitud mínima de 6 residuos de nucleótidos. Los oligonucleótidos de cualquier tamaño mayores de 6 nucleótidos (incluso de muchos kb de largo) son capaces de inducir una respuesta inmunitaria si están presentes suficientes motivos inmunoestimulantes, debido a que oligonucleótidos más grandes se degradan dentro de las células. Los oligonucleótidos de la invención no son plásmidos ni vectores de expresión. En una realización, el oligonucleótido CpG revelado en el presente documento comprende sustituciones o modificaciones, tales como en las bases y/o azúcares como se describe en los párrafos 134 a 147 del documento WO2007/026190.

En una realización, el oligonucleótido CpG de la presente invención está químicamente modificado. Se conocen ejemplos de modificaciones químicas por la persona experta y se describen, por ejemplo, en Uhlmann E. y col. (1990), Chem. Rev. 90: 543, S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, EE.UU. 1993; Crooke, S.T. y col. (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36: 107-129; y Hunziker J. y col., (1995), Mod. Synth. Methods 7: 331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una o más modificaciones, en la que cada modificación está localizada en un puente internucleósido de fosfodiéster particular y/o en una unidad de β -D-ribosa particular y/o en una posición de base de nucleósido natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que está compuesto de ADN o ARN natural.

En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos que contienen CpG podrían estar simplemente mezclados con vehículos inmunógenos de acuerdo con los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, documento WO03/024480).

En una realización particular de la presente invención, cualquiera de las vacunas reveladas en el presente documento comprende desde 2 μ g hasta 100 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente de 0,1 mg a 50 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente desde 0,2 mg hasta 10 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente desde 0,3 mg hasta 5 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente desde 0,3 mg a 5 mg de oligonucleótido CpG, incluso preferentemente desde 0,5 hasta 2 mg de oligonucleótido CpG, incluso preferentemente desde 0,75 hasta 1,5 mg de oligonucleótido CpG. En una realización preferida, cualquiera de las vacunas descrita en el presente documento comprende aproximadamente 1 mg de oligonucleótido CpG.

Vacunas neumocócicas

La vacuna neumocócica de la presente invención comprenderá típicamente antígenos de sacáridos capsulares conjugados, en los que los sacáridos se derivan de al menos siete serotipos de *S. pneumoniae*. El número de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* puede variar desde 7 serotipos diferentes (o "v", valencias) a 23 serotipos (23v). En una realización existen 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 serotipos diferentes. En una realización hay 10 o 11 serotipos diferentes. En una realización hay 7 o 13 serotipos diferentes. Los antígenos sacarídicos capsulares están conjugados a una proteína transportadora como se describe en la presente memoria más adelante.

- En otra realización de la invención, la vacuna puede comprender sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados y sacáridos de *S. pneumoniae* no conjugados. Preferentemente, el número total de serotipos sacarídicos es inferior o igual a 23. Por ejemplo, la vacuna puede comprender 7 serotipos conjugados y 16 sacáridos no conjugados. En otra realización, la vacuna puede comprender 13 serotipos conjugados y 10 sacáridos no conjugados. En una forma similar, la vacuna puede comprender 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 sacáridos conjugados y 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 o 7, respectivamente, sacáridos no conjugados.
1. La vacuna de la invención comprende sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, conjugados individualmente a CRM197.
 2. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 1.
 3. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1 o 2 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 5.
 4. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2 o 3 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* del serotipo 7F.
 5. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3 o 4 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 3.
 6. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4 o 5 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 6A.
 7. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5 o 6 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 19A.
 8. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 22F.
 9. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 15.
 10. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 8.
 11. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 12F.
 12. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 2.
 13. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 9N.
 14. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 10A.
 15. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 11A.
 16. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 11A.
 17. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 17F.
 18. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 20.
 19. En otra realización la vacuna de la invención comprende además del punto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 anterior, sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados del serotipo 33F.
- La vacuna de la invención comprende sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, conjugados individualmente a CRM197.
- En una realización la vacuna de la invención comprende sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, conjugados individualmente a CRM197.

En una realización preferida, los antígenos sacarídicos capsulares están conjugados con una proteína transportadora seleccionada independientemente del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, PhtD, condensaciones de PhtDE (en particular las descritas en los documentos WO 01/98334 y WO 03/54007), neumolisina detoxificada y proteína D.

- 5 En una realización preferida, los antígenos sacarídicos capsulares están conjugados a proteínas transportadoras que están seleccionadas del grupo que consiste en: DT (toxina diftérica), TT (tóxico de tétanos) o fragmento C de TT, CRM197 (una variante no tóxica pero antigénicamente idéntica de la toxina diftérica) otros mutantes puntuales de DT, tales como CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida y col. J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 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; delección o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones reveladas en los documentos 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 reveladas en el documento US 5917017 o US 6455673; o el fragmento revelado en el documento US 5843711, neumolisina neumocócica (Kuo y col. (1995) *Infect Immun* 63; 2706-13) que incluye ply detoxificada de alguna manera por ejemplo dPLY-GMBS (documentos WO 04081515, PCT/EP2005/010258) o dPLY-formol, PhtX, que incluye PhtA, PhtB, PhtD, PhtE (secuencias de PhtA, PhtB, PhtD o PhtE se revelan en los documentos WO 00/37105 o WO 00/39299) y condensaciones de proteínas Pht por ejemplo condensaciones PhtDE, condensaciones PhtBE, Pht A-E (documentos WO 01/98334, WO 03/54007, WO2009/000826), OMPC (proteína de membrana externa meningocócica (habitualmente extraída del serogrupo B de *N. meningitidis*), documento EP0372501), PorB (a partir de *N. meningitidis*), PD (proteína de de *Haemophilus influenzae* -véase, por ejemplo, el documento EP 0 594 610 B), o equivalentes inmunológicamente funcionales de las mismas, péptidos sintéticos (documentos EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas pertussis (documentos WO 98/58668, EP0471 177), citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento u hormonas (documentos WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epitopos de células T CD4+ humanas a partir de antígenos derivados de diversos patógenos (Falugi y col. (2001) *Eur J Immunol* 31; 3816-3824) tales como proteína N19 (Baraldoi y col. (2004) *Infect Immun* 72; 4884-7), proteína PsPA de la superficie neumocócica (documento WO 02/091998), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761).

En una realización, los antígenos sacarídicos capsulares están conjugados a DT (toxide de difteria). En otra realización, los antígenos sacarídicos capsulares están conjugados a TT (tóxico de tétanos).

- 30 En otra realización, los antígenos sacarídicos capsulares están conjugados al fragmento C de TT.

En otra realización, los antígenos sacarídicos capsulares están conjugados a PD (proteína D de *Haemophilus influenzae*: véase, por ejemplo, el documento EP 0 594 610 B).

- 35 En una realización preferida, los antígenos sacarídicos capsulares de la invención están conjugados a la proteína CRM197. La proteína CRM197 es una forma no tóxica de toxina diftérica, pero es inmunológicamente indistinguible de la toxina diftérica. CRM197 se produce por *C. diphtheriae* infectadas por el fago no toxigénico $\beta 197^{tox-}$ creada por mutagénesis de nitrosoguanidina del corinefago beta toxigénico (Uchida, T. y col. 1971, *Nature New Biology* 233: 8-11). La proteína CRM197 tiene el mismo peso molecular que la toxina diftérica pero difiere de la misma por un cambio de base individual (guanina a adenina) en el gen estructural. Este cambio de base individual causa una sustitución aminoacídica (de ácido glutámico por glicina) en la proteína madura y elimina las propiedades tóxicas de toxina diftérica. La proteína CRM197 es un transportador dependiente de células T seguro y efectivo para sacarídicos. Detalles adicionales sobre CMR197 y producción de las mismas se pueden encontrar por ejemplo en el documento 5.614.382.

- 45 En una realización, si la proteína transportadora es la misma para 2 o más sacáridos en la composición, los sacáridos podrían conjugarse a la misma molécula de la proteína transportadora (moléculas transportadoras que tienen 2 sacáridos diferentes conjugados a ellas) [véase por ejemplo documento WO 04/083251].

Alternativamente los sacáridos puede conjugarse cada uno individualmente a diferentes moléculas de la proteína transportadora (cada molécula de proteína transportadora sólo tiene un tipo de sacárido conjugado a ella). En dicha realización, se dice que los sacáridos capsulares están conjugados individualmente a la proteína transportadora.

- 50 Los antígenos sacarídicos capsulares de la presente invención son de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* y están conjugados a una o más proteínas transportadoras. En una realización la vacuna de la realización comprende 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 conjugados sacarídicos capsulares de serotipos diferentes en los que CRM197 es la proteína transportadora.

La vacuna de la invención comprende 7 conjugados sacarídicos capsulares de serotipos diferentes en los que CRM197 es la proteína transportadora.

- 55 En una realización la vacuna de la invención comprende 10 conjugados sacarídicos capsulares de serotipos diferentes en los que CRM197 es la proteína transportadora.

En una realización la vacuna de la invención comprende 11 conjugados sacarídicos capsulares de serotipos

diferentes en los que CRM197 es la proteína transportadora.

En una realización la vacuna de la invención comprende 13 conjugados sacarídicos capsulares de serotipos diferentes en los que CRM197 es la proteína transportadora.

5 En una realización la vacuna de la invención comprende 23 conjugados sacarídicos capsulares de serotipos diferentes en los que CRM197 es la proteína transportadora.

La vacuna de la invención comprende un sacárido de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugados a CRM197.

En una realización, la vacuna de la invención comprende el sacárido de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F conjugados a CRM197.

10 En una realización, la vacuna de la invención comprende el sacárido de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugados a CRM197.

En una realización, la vacuna de la invención comprende el sacárido de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugados a CRM197.

15 En una realización, la vacuna de la invención comprende el sacárido de 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 conjugados a CRM197.

20 El término "sacárido" a lo largo de toda esta memoria descriptiva puede indicar polisacárido u oligosacárido e incluye ambos. Polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* comprenden unidades de oligosacáridos de repetición que pueden contener hasta 8 residuos de azúcar. Para una revisión de las unidades de oligosacáridos para los principales serotipos de *Streptococcus pneumoniae* véase JONES, Christopher. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. An. Acad. Bras. Cienc, junio de 2005, vol. 77, N.º 2, páginas 293-324. Tabla II ISSN 0001- 3765.

25 Los antígenos sacarídicos capsulares de la invención se preparan por técnicas estándar conocidas por aquellos expertos en la técnica. Típicamente los conjugados de polisacáridos se preparan por procedimientos separados y se formulan en una formulación de dosificación individual. Por ejemplo, en una realización, cada serotipo de polisacárido neumocócico se cultiva en un medio basado en soja. Los polisacáridos individuales se purifican entonces a través de centrifugación, precipitación, ultrafiltración y cromatografía en columna. Los polisacáridos purificados se activan químicamente para fabricar los sacáridos capaces de reaccionar con la proteína transportadora. Una vez activado, cada polisacárido capsular está conjugado por separado con una proteína transportadora para formar un glicoconjugado. En una realización, cada polisacárido capsular está conjugado a la misma proteína transportadora. En esta realización, la conjugación se efectúa por aminación reductora. La activación química del polisacárido y la conjugación subsiguiente a la proteína transportadora se lleva a cabo por medios convencionales. Véanse, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos N.º 4.673.574 y 4.902.506.

35 Después de la conjugación del polisacárido capsular a la proteína transportadora, los conjugados polisacárido-proteína se purifican (enriquecidos con respecto a la cantidad de conjugado polisacárido-proteína) por una diversidad de técnicas. Estas técnicas incluyen operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna, y filtración en profundidad. Véanse para ejemplos documentos US2007/0184072 o WO2008/079653. Después de que los glicoconjugados individuales se purifican, están compuestos para formular la vacuna de la presente invención. La formulación de la composición inmunógena de la presente invención puede llevarse a cabo usando los procedimientos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, los conjugados neumocócicos individuales se pueden formular con un vehículo fisiológicamente aceptable para preparar la composición. Ejemplos de tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

40 La cantidad de conjugado en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos, significativos, en vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo de qué inmunógeno específico se usa y como se presenta. En una realización, cada dosis comprende 0,1 a 1000 µg de cada sacárido o conjugado sacárido-proteína, preferentemente 2 a 100 µg, lo más preferentemente 4 a 40 µg.

En una realización, cada dosis comprende entre 0,1 y 20 µg, 1 y 10 µg o 1 y 5 µg de sacárido.

50 En una realización, la vacuna de la invención contiene cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* a una dosis de entre 0,1-20 µg, 0,5-10 µg; 0,5-5 µg o 1-5 µg de sacárido. En una realización, los sacáridos capsulares pueden estar presentes en diferentes dosificaciones, por ejemplo algunos sacáridos capsulares pueden estar presentes en una dosis de aproximadamente o de exactamente 2 µg o algunos sacáridos capsulares pueden estar presentes en una dosis de aproximadamente o de exactamente 4 µg.

En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido de los serotipos 4, 6B, 9V, 14,

18C, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en el que cada sacárido vascular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 2 µg salvo para 6B que está a una dosis de 4 µg.

5 En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en el que cada sacárido vascular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 4 µg salvo para 6B que está a una dosis de 8 µg.

En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en el que cada sacárido vascular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 6 µg salvo para 6B que está a una dosis de 12 µg.

10 En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en el que cada sacárido vascular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 8 µg salvo para 6B que está a una dosis de 16 µg.

En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en los que cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 2 µg salvo para 6B que está a una dosis de 4 µg.

15 En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en los que cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 4 µg salvo para 6B que está a una dosis de 8 µg.

20 En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en los que cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 6 µg salvo para 6B que está a una dosis de 12 µg.

En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en los que cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 8 µg salvo para 6B que está a una dosis de 16 µg.

25 En una realización particular de la presente invención, la vacuna revelada en el presente documento contiene desde 5 hasta 500 µg, preferentemente 10 a 200 µg, incluso más preferentemente, 20 a 100 µg de proteína transportadora CRM197.

En una realización de la presente invención, la vacuna revelada en el presente documento contiene 20 a 50 µg, preferentemente 20 a 40 µg, incluso más preferentemente 25 a 30 µg, incluso más preferentemente aproximadamente 28 o 29 µg de proteína transportadora CRM197.

30 En una realización de la presente invención, la vacuna revelada en el presente documento contiene 40 a 100 µg, preferentemente 40 a 80 µg, incluso más preferentemente 50 a 60 µg, incluso más preferentemente aproximadamente 57 o 58 µg de proteína transportadora CRM197.

En una realización particular de la presente invención, la vacuna revelada en el presente documento contiene cloruro de sodio y/o tampón de succinato de sodio como excipientes.

35 En una realización, la vacuna neumocócica a usar en el presente documento es la vacuna neumocócica conjugada heptavalente (Prevenar) o la vacuna neumocócica conjugada 13-valente revelada en el documento US2007/0184072–Prevenar 13). Prevenar heptavalente contiene sacárido a partir de serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F individualmente conjugado a CRM197. Prevenar 13-valente contiene sacárido a partir de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F individualmente conjugado a CRM197.

40 En una realización particular de la presente invención, la vacuna revelada en el presente documento contiene tampón de cloruro de sodio como excipientes.

Coadyuvante(s) adicional(es)

45 En algunas realizaciones, las vacunas neumocócicas como se describen en el presente documento comprenden al menos uno, dos o tres coadyuvantes además del, al menos un, coadyuvante agonista de TLR-9 revelado en el presente documento. El término "coadyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno. Los antígenos pueden actuar principalmente como un sistema de administración, principalmente como un modulador inmunitario o que tiene características fuertes o ambos. Los coadyuvantes adecuados incluyen aquellos adecuados para usar en mamíferos, incluyendo seres humanos.

50 Ejemplos de coadyuvantes de tipo de sistema de administración que se pueden usar en seres humanos incluyen, pero no se limitan a, alumbre (por ejemplo, envases alveolados de fosfato de aluminio, sulfato de aluminio o hidróxido de aluminio), fosfato de calcio, liposomas, emulsiones de aceite en agua tales como MF59 (escualeno al 4,3 % p/v, polisorbato 80 (Tween 80) al 0,5 % p/v, trioleato de sorbitán al 0,5 % p/v (Span 85)), emulsiones de agua-en-aceite tales como Montanide y micropartículas o nanopartículas de poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLG).

Ejemplos de coadyuvantes de tipo modulador inmunitario adecuados que se pueden usar en seres humanos incluyen, pero no se limitan a extractos de saponinas de la corteza del arbusto del jabón (QS21, Quil A), agonistas de TLR4 tales como MPL (monofosforilo del lípido A), 3dMPL (MPL 3-O-desacetilado) o GLA-AQ, mutantes LT/CT, citoquinas tales como las distintas interleucinas (por ejemplo IL-2, IL-12) o GM-CSF y similares.

- 5 Ejemplos de coadyuvantes de tipo modulador inmunitarios adecuados con características moduladoras tanto de administración como inmunitarias que se pueden usar en seres humanos incluyen, pero no se limitan a ISCOMS (véase, por ejemplo, Sjölander y col. (1998) *J. Leukocyte Biol.* 64: 713; documentos WO90/03184, WO96/11711, WO 00/48630, WO98/36772, WO00/41720, WO06/134423 y WO07/026190) o GLA-EM que es una combinación de un agonista de TLR4 y una emulsión de aceite en agua.
- 10 Para aplicaciones veterinarias incluida, pero sin limitación, experimentación con animales, se puede usar Coadyuvante de Freund Completo (CFA), Coadyuvante de Freund Incompleto (IFA), Emulsigen, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominado MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, lípido A monofosforilo, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2 %/Tween 80.

Otros coadyuvantes ejemplares para potenciar la efectividad de las vacunas neumocócicas como se describen en el presente documento incluyen, pero no están limitados a: (1) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como por ejemplo (a) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero L121 bloqueado por plurónico al 5 % y thr-MDP bien microfluidizado dentro de una emulsión submicrométrica o bien removido en vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor y (b) sistema coadyuvante RIBI™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de pared celular bacteriana tales como monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DETOX™); (2) coadyuvantes de saponina, tales como QS21, STIMULON™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), Abisco® (Isconova, Suecia), o Iscomatrix® (Commonwealth Serum Laboratories, Australia), o las partículas generadas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos de inmunoestimulación), ISCOM que pueden estar desprovistos de detergente adicional por ejemplo documento WO00/07621; (3) Coadyuvante de Freund Completo (CFA) y Coadyuvante de Freund Incompleto (IFA); (4) citoquinas, tales como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (documento WO99/44636), etc.), interferones (por ejemplo interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (5) monofosforilo del lípido A (MPL) o MPL 3-O-deacilado (3dMPL) (véanse por ejemplo, los documentos GB-2220221, EP-A-0689454), opcionalmente en la ausencia sustancial de alumbre cuando se usa con sacáridos neumocócicos (véase por ejemplo el documento WO00/56358); (6) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (véanse por ejemplo los documentos EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231); (7) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno (véase por ejemplo WO99/52549); (8) un tensioactivo de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol (documento WO01/21207) o un éter alquílico de polioxietileno o un tensioactivo de éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (documento WO01/21152); (9) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulante (por ejemplo un oligonucleótido CpG) (documento WO00/62800); (10) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica (véase por ejemplo el documento WO00/23105); (11) una saponina y una emulsión de aceite en agua por ejemplo el documento WO99/11241; (12) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IM2 (opcionalmente + un esteroles) por ejemplo el documento WO98/57659; (13) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición. Los péptidos de muramilo incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-25 acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (no-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutarninil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE), etc.

En una realización preferida, las vacunas neumocócicas como se revelan en el presente documento comprenden alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, o sulfato de aluminio como coadyuvante adicional para el, al menos un, coadyuvante de agonista TLR-9 revelado en el presente documento.

En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido a partir de serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en los que cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 2 µg salvo para 6B que está a una dosis de 4 µg, comprendiendo adicionalmente 0,5 mg de fosfato de aluminio y opcionalmente tampón de cloruro de sodio y de succinato de sodio como excipientes.

55 En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido a partir de serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en los que cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 4 µg salvo para 6B que está a una dosis de 8 µg, comprendiendo adicionalmente 1 mg de fosfato de aluminio y opcionalmente tampón de cloruro de sodio y de succinato de sodio como excipientes.

60 En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido a partir de serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en los que cada sacárido capsular de *S. pneumoniae*

está a una dosis de 6 µg salvo para 6B que está a una dosis de 12 µg, comprendiendo adicionalmente 1,5 mg de fosfato de aluminio y opcionalmente tampón de cloruro de sodio y de succinato de sodio como excipientes.

5 En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido a partir de serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en los que cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 8 µg salvo para 6B que está a una dosis de 16 µg, comprendiendo adicionalmente 2 mg de fosfato de aluminio y opcionalmente tampón de cloruro de sodio y de succinato de sodio como excipientes.

10 En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido a partir de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en los que cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 2 µg salvo para 6B que está a una dosis de 4 µg comprendiendo adicionalmente 1,5 mg de fosfato de aluminio y opcionalmente tampón de cloruro de sodio y de succinato de sodio como excipientes.

15 En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido a partir de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en los que cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 4 µg salvo para 6B que está a una dosis de 8 µg comprendiendo adicionalmente 1,5 mg de fosfato de aluminio y opcionalmente tampón de cloruro de sodio y de succinato de sodio como excipientes.

20 En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido a partir de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en los que cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 6 µg salvo para 6B que está en una dosis de 12 µg comprendiendo adicionalmente 1,5 mg de fosfato de aluminio y opcionalmente tampón de cloruro de sodio y de succinato de sodio como excipientes.

25 En una realización particular de la presente invención, la vacuna contiene sacárido a partir de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197 en los que cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* está a una dosis de 8 µg salvo para 6B que está a una dosis de 16 µg comprendiendo adicionalmente 1,5 mg de fosfato de aluminio y opcionalmente tampón de cloruro de sodio y de succinato de sodio como excipientes.

En una realización, la vacuna neumocócica es la vacuna neumocócica conjugada heptavalente (Prevenar) o la vacuna neumocócica conjugada 13-valente como se describe en el documento US2007/0184072 (13vPnC).

Sujetos inmunodeprimidos

30 El sujeto a vacunar con las vacunas de la presente invención es un sujeto inmunodeprimido, siendo dicho sujeto un ser humano.

Un individuo inmunodeprimido se define generalmente como una persona que presenta una capacidad atenuada o reducida para montar una defensa humoral o celular normal frente a provocación por agentes infecciosos.

35 El sujeto inmunodeprimido a vacunar con la vacuna neumocócica sufre de una enfermedad o afección que daña el sistema inmunitario y da como resultado una respuesta de anticuerpos que es insuficiente para proteger contra la enfermedad neumocócica o para tratarla.

40 El sujeto inmunodeprimido a vacunar sufre de infección por VIH o de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y está sometido a terapia antirretroviral altamente activa (HAART). En una realización, dicha HAART consiste en un régimen de 3 fármacos que incluye un inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídico, un inhibidor de proteasa y/o un inhibidor de transcriptasa inversa análogo a nucleósidos (por ejemplo abacavir) o un régimen de 2 fármacos que incluye una combinación de un inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídico y un inhibidor de proteasas.

En una realización particular, el sujeto inmunodeprimido a vacunar es un paciente infectado por VIH no virémico. En otra realización, el sujeto inmunodeprimido a vacunarse es un paciente infectado por VIH virémico.

45 En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar sufre de tuberculosis o de enfermedades transmitidas sexualmente, por ejemplo sífilis o hepatitis.

En una realización de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar sufre de malnutrición.

50 En una realización de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar sufre de envejecimiento. En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunarse es un ser humano adulto de 55 años de edad o mayor, más preferentemente un ser humano adulto de 65 años de edad o mayor. En una realización, el sujeto inmunodeprimido a vacunar es un ser humano adulto de 70 años de edad o mayor, de 75 años de edad o mayor o de 80 años de edad o mayor.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar está tomando un

fármaco o tratamiento que reduce la resistencia corporal a la infección.

5 En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar está tomando un fármaco seleccionado del grupo que consiste en quimioterapia (por ejemplo fármacos del cáncer), fármacos antiirreumáticos que modifican la enfermedad, fármacos inmunosupresores después de trasplante de órganos y glucocorticoides.

10 En una realización de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar está tomando un fármaco inmunodepresor de uso oral seleccionado a partir del grupo que consiste en: tacrolimus (Prograf), micofenolato de mofetilo (CellCept), sirolimus (Rapamune), prednisona, ciclosporina (Neoral, Sandimmune, Gengraf) y azatioprina (Imuran). En una realización, el sujeto inmunodeprimido está tomando al menos dos o tres de dichos fármacos inmunodepresores de uso oral.

15 En una realización de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar está tomando un fármaco inmunodepresor seleccionado a partir del grupo que consiste en: everolimus, ácido micofenólico, corticosteroides (tales como prednisona o hidrocortisona), anticuerpos anti-receptor de IL-2R α monoclonales (tales como Basiliximab o Daclizumab), globulina anti-timocítica (ATG) y globulina anti-linfocítica (ALG). En una realización, el sujeto inmunodeprimido está tomando al menos dos o tres de dichos fármacos inmunodepresores.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar ha sufrido trasplante de órganos, o trasplante de médula ósea o implantación coclear.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar ha sufrido radioterapia.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar es un fumador.

20 En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar sufre de asma y se trata con terapia de corticosteroides de uso oral.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar es un nativo de Alaska o un indio americano.

25 En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar tiene un recuento de glóbulos blancos (recuento de leucocitos) por debajo de 5×10^9 células por litro, o por debajo de 4×10^9 células por litro, o por debajo de 3×10^9 células por litro, o por debajo de 2×10^9 células por litro, o por debajo de 1×10^9 células por litro, o por debajo de $0,5 \times 10^9$ células por litro, o por debajo de $0,3 \times 10^9$ células por litro, o por debajo de $0,1 \times 10^9$ células por litro.

30 Recuento de glóbulos blancos (recuento de leucocitos): El número de glóbulos blancos (WBC) en la sangre. El WBC se mide habitualmente como parte del CBC (recuento sanguíneo completo). Los glóbulos blancos son las células que luchan contra la infección en la sangre y son distintas de los glóbulos rojos (portadores de oxígeno) conocidos como eritrocitos. Hay diferentes tipos de glóbulos blancos, incluyendo neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN), células en banda (neutrófilos ligeramente inmaduros), linfocitos de tipo T (células T), linfocitos de tipo B (células B), monocitos, eosinófilos y basófilos. Todos los tipos de glóbulos blancos están reflejados en el recuento de glóbulos blancos. El intervalo normal para el recuento de glóbulos blancos está habitualmente entre 4.300 y 10.800 células por milímetro cúbico de sangre. Esto también puede referirse a la cuenta de leucocitos y puede expresarse en unidades internacionales como $4,3-10,8 \times 10^9$ células por litro.

35 En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar sufre de neutropenia. En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar tiene un recuento de neutrófilos por debajo de 2×10^9 células por litro, o por debajo de 1×10^9 células por litro, o por debajo de $0,5 \times 10^9$ células por litro, o por debajo de $0,1 \times 10^9$ células por litro, o por debajo de $0,05 \times 10^9$ células por litro. Un recuento de glóbulos blancos bajo o "neutropenia" es una afección caracterizada por niveles anormalmente bajos de neutrófilos en la sangre circulante. Los neutrófilos son una clase específica de células sanguíneas blancas que ayudan a evitar y a combatir infecciones. La razón más frecuente de que los pacientes de cáncer experimenten neutropenia es un efecto secundario de la quimioterapia. La neutropenia inducida por quimioterapia incrementa un riesgo del paciente de infección e interrumpe el tratamiento de cáncer.

40 Cuantos menos sean los neutrófilos de la sangre y más tiempo permanezcan los pacientes sin suficientes neutrófilos, más susceptibles son los pacientes a desarrollar una infección bacteriana o fúngica. Los neutrófilos son un componente principal de los mecanismos de defensa antibacterianos. Según el recuento de neutrófilos cae por debajo de $1,0$, $0,5$, y $0,1 \times 10^9/l$, la frecuencia de infección que pone en peligro la vida se eleva bruscamente desde 10 % a 19 % y 28 %, respectivamente.

45 En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido a vacunar tiene un recuento de células CD4+ por debajo de $500/mm^3$, o un recuento de células CD4+ por debajo de $300/mm^3$, o un recuento de células CD4+ por debajo de $200/mm^3$, recuento de células CD4+ por debajo de $100/mm^3$, recuento de células CD4+ por debajo de $75/mm^3$, o recuento de células CD4+ por debajo de $50/mm^3$.

Las pruebas de células CD4 se comunican normalmente como el número de células en mm^3 . Los recuentos de CD4 normales son entre 500 y 1600, y los recuentos de CD8 están entre 375 y 1100. Los recuentos de CD4 caen drásticamente en personas con VIH.

- 5 En una realización de la invención, cualquiera de los sujetos inmunodeprimidos revelados en el presente documento es un ser humano masculino o un ser humano femenino.

Régimen

En algunos casos, se necesita tan poco como una dosis de la vacuna de acuerdo con la invención, pero en algunas circunstancias, tales como las afecciones de deficiencia inmunitaria mayor, se puede administrar una segunda, tercera o cuarta dosis.

- 10 En una realización, una dosis de sensibilización se da en el día 0 y uno o más refuerzos se dan a intervalos que varían de aproximadamente 2 a aproximadamente 24 semanas, preferentemente con un intervalo de dosificación de 4-8 semanas.

En una realización, una dosis de sensibilización se da en el día 0 y los refuerzos se dan aproximadamente 3 meses más tarde.

- 15 Como se muestra en la parte de ejemplos, algunos de los defectos de la vacunación actual pueden superarse usando la vacuna de la invención. En particular la vacuna de la invención puede reducir el número de vacunaciones requeridas para lograr seroprotección, acelerar seroconversión, posiblemente permitir vacunación post-exposición, reducir la proporción de no individuos que no responden, reducir la cantidad de antígeno requerida, aumentar avidez del anticuerpo y actividad protectora y/o conducir a niveles de anticuerpos más continuos.

- 20 Estas ventajas son particularmente interesantes cuando se tratan pacientes inmunodeprimidos.

Ejemplo

Ejemplo 1: Respuesta inmunitaria a vacunación neumocócica coadyuvada por agonista de receptor similar a Toll 9 en adultos infectados por VIH

Se ha emprendido un estudio en fase II de 96 pacientes infectados por VIH.

- 25 Objetivos:

Objetivo principal:

- Comparar números de individuos de respuesta elevada a la vacuna -definidos como los que presentan incremento de 2 veces en niveles de IgG y niveles de IgG $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ para al menos 5 de 7 serotipos neumocócicos (por medidas cuantitativas de IgG)- en el grupo de CpG 7909 frente al grupo control.

- 30 Objetivos secundarios:

- Comparar la respuesta de anticuerpos cualitativa (funcional) a la vacunación neumocócica con o sin CpG 7909
- Evaluar la seguridad y tolerancia de CpG 7909 como un coadyuvante de vacunas neumocócicas
- Analizar cambios en estatus del transportador neumocócico después de vacunación neumocócica

Parámetros de valoración principales:

- 35 Eficacia:

Principal: Medida cuantitativa de anticuerpos anticapsulares específicos (7 serotipos)

Secundarios: Actividad funcional de anticuerpos anticapsulares específicos (serotipos neumocócicos 6B, 14, 19F y 23F); Número e intensidad de acontecimientos adversos y de acontecimientos adversos graves; Cambios microbiológicos en colonización faríngea neumocócica; Recuento de CD4 basal y medida de sCD163

- 40 Seguridad/Tolerabilidad:

Acontecimientos adversos (AE); Acontecimientos adversos graves (SAE); Pruebas de laboratorio (hematología, química clínica es decir carga viral (ARN de VIH) y recuento de CD4); Examen físico.

Diseño de estudio: Estudio controlado por placebo, al azar, de doble ciego. Tamaño de muestra total: 96 participantes (48 por grupo).

- 45 Fármacos y formulaciones de prueba: CpG 7909 (un agonista de receptor similar a Toll 9 sintético) formulado en

tampón PBS. CPG 7909 es un ODN CpG de Clase B de secuencia 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3' (SEC ID N.º: 5) y se ha sintetizado con un armazón totalmente de fosforotioato.

Dosificación de fármaco de prueba: 1 mg de CpG 7909 (100 µl) mezclado con cada vacunación neumocócica.

5 Controles: 100 µl de un tampón PBS neutro (idéntico en color y viscosidad al fármaco de prueba) con cada vacuna neumocócica.

Vía de administración: Inyección intramuscular. Enmascaramiento: Estudio de doble ciego. Inscripción: Aleatorización;

Los pacientes que reúnen los requisitos necesarios se han aleatorizado en una proporción de 1:1 para recibir vacunación neumocócica con o sin CpG 7909.

10 Inmunización:

Las vacunas se mantuvieron en su recipiente original de acuerdo con la descripción del fabricante y se mezclaron con el coadyuvante (CpG 7909 o Placebo) inmediatamente antes de la inmunización. La inmunización se ha hecho en el músculo deltoides superior izquierdo o derecho a la preferencia del sujeto.

Duración del ensayo clínico para cada participante: 10 meses desde la primera vacunación al último seguimiento.

15 Retirada del sujeto del estudio:

Desde una perspectiva de análisis, una "retirada" del estudio es cualquier sujeto que no regresó para la visita de conclusión prevista en el protocolo.

20 Un sujeto se clasifica para "retirada" del estudio cuando ningún procedimiento de estudio ha tenido lugar, no se ha llevado a cabo ningún seguimiento y no se ha recogido ninguna información adicional para este sujeto desde la fecha de la retirada/el último contacto.

Las retiradas no se han sustituido.

Retirada del sujeto del producto en fase de investigación

25 Una retirada del producto en fase de investigación es cualquier sujeto que no recibió el tratamiento completo, es decir cuando ninguna dosis planeada adicional se administra a partir de la fecha de retirada. Una retirada de sujetos del producto investigacional puede no retirarse necesariamente del estudio según procedimientos de estudio adicionales o se puede llevar a cabo revisión (de seguridad o de inmunogenicidad) si está planeado en el protocolo.

Datos a incluir en el cuaderno de recogida de datos:

- Fecha de nacimiento, sexo, raza, altura, peso, número de estudio
- Acontecimientos adversos comunicados por el sujeto incluyendo punto de inicio y duración (tiempo hasta la resolución)
- Hallazgos positivos durante exploración física
- Historial médico
- Otras vacunaciones recibidas aparte del estudio durante el periodo de estudio
- Cualesquiera cambios en la medicación regular durante el tiempo de estudio
- 35 • Condiciones o signos preexistentes y/o síntomas presentes en un sujeto antes del comienzo de la vacunación de estudio/primer vacunación
- Todos los hallazgos de laboratorio durante el tiempo del estudio

Criterios de inclusión de participantes:

40 1) Consentimiento informado y declaración de autoridad proporcionados de acuerdo con la práctica reguladora y ética local usando una lámina de información del participante y formulario de consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética responsable.

2) Los participantes varones o mujeres tenían una edad \geq 18 años.

3) Individuos seropositivos a VIH

Criterios de exclusión de participantes:

1) Embarazo según se determina por un positivo en orina de beta-hCG (si es mujer).

2) Participante poco dispuesto a usar procedimientos de contracepción fiables durante la duración del ensayo. Los procedimientos fiables del control de natalidad incluyen: anticonceptivos farmacológicos que incluyen administración oral, parenteral, y transcutánea; condones con espermicida; diafragma con espermicida, esterilización quirúrgica; anillo vaginal; dispositivo intrauterino; abstinencia; y postmenopausia (si es mujer).

3) Actualmente dando el pecho (si es mujer).

4) El último recuento de CD4 < 200 x10⁶ células/μl

5) Carga viral (ARN de VIH) > 50 copias/ml si está en HAART (definida como al menos tres antiretrovirales que incluyen bien un inhibidor de proteasa o bien un NNRTI, es decir 300/150 mg de combivir x2 + 600 mg de estocrina x1 durante un mínimo de 6 meses)

6) Alistamiento anterior en este estudio.

7) Cualquier afección médica, psiquiátrica, social, o profesional u otra responsabilidad que, a juicio del Investigador Principal (IP), interferiría con la evaluación de los objetivos del estudio (tal como abuso de alcohol grave, abuso de fármacos grave, demencia).

8) Incapaces de seguir el régimen del protocolo

9) Vacunación neumocócica 5 años o menos antes de proceder a inclusión

10) Participación planificada en otros ensayos de vacunación durante el tiempo del estudio

Procedimientos:

Los participantes que dan su consentimiento que pasan los criterios de inclusión/exclusión se han inscrito en el estudio. Las muestras de sangre para medidas de parámetros de línea base se han extraído antes de proceder a inmunización. En la aleatorización, los participantes se han asignado 1:1 a uno de dos regímenes de estudio:

- Grupo experimental: Dos dosis de vacunación neumocócica conjugada heptavalente (Prevenar®, Wyeth) + 1 mg de CpG 7909 (día 0), dos dosis de vacunación neumocócica conjugada heptavalente (Prevenar®, Wyeth) + 1 mg de CpG 7909 (día 90) y una dosis de vacuna polisacáridica 23-valente (Pneumo Novum®, Sanofi Pasteur MSD) + 1 mg de CpG 7909 (día 270)

- Grupo control: Dos dosis de vacunación neumocócica conjugada heptavalente (Prevenar®, Wyeth) + 100 μl de placebo (día 0), dos dosis de vacunación neumocócica conjugada heptavalente (Prevenar®, Wyeth) + 100 μl de placebo (día 90) y una dosis de vacuna polisacáridica 23-valente (Pneumo Novum®, Sanofi Pasteur MSD)+100 μl de placebo (día 270).

Las muestras de sangre se extrajeron y el seguimiento por el médico incluyó examen físico e historial médico, registro de AE (Acontecimientos Adversos)/SAE (Reacciones Adversas Graves), historial de vacunación aparte del estudio y cualquier otra información que pueda ser relevante para documentar en la CRF. Una visita concluyente se realizó en el día 300.

Un sujeto que volvió para la visita concluyente o estuvo disponible para el contacto concluyente previsto en este protocolo se consideró que había completado el estudio.

Vacunas e inyecciones de fármaco de prueba/placebo:

Todos los individuos se dosificaron a los 0, 90 y 270 días. Todas las inmunizaciones se hicieron en el músculo deltoides del brazo derecho o del brazo izquierdo (de acuerdo con la preferencia de los participantes).

- En el día 0 y en el día 90 los participantes recibieron una inyección intramuscular o dosis doble de Prevenar 1,0 ml + 0,1 ml de fármaco de prueba (CpG 7909)/placebo. En ambos casos, el volumen inyectado en el brazo es 1,1 ml.

- En el día 270 los participantes en el estudio recibieron inyecciones intramusculares de 0,5 ml de Pneumo Novum + 0,1 ml de fármaco de prueba (CpG 7909)/placebo. En todos los casos, el volumen inyectado en el brazo es 1,1 ml.

Los investigadores y participantes no fueron conscientes de si se administró el fármaco experimental o la inyección de control. El volumen y la aparición de cada producto de inyección fueron idénticos.

Parámetro principal de eficacia y análisis de respuesta de anticuerpos

El estudio se hizo funcionar detectando diferencias entre el grupo experimental y el grupo control en los individuos de respuesta elevada a la vacuna neumocócica definidos según incremento de dos veces de IgG y niveles de IgG ≥ 1 μg/ml para al menos 5 de 7 serotipos neumocócicos (por medidas cuantitativas de IgG). El estudio no se hizo

funcionar para detectar diferencias en la incidencia de la neumonía o para confirmar enfermedad neumocócica invasiva/no invasiva. Esto debería requerir un número sustancial de participantes y un periodo de seguimiento más largo. La medición más ampliamente usada de respuesta inmunitaria a vacunación neumocócica es la detección cuantitativa de anticuerpos anticapsulares específicos de serotipo. Datos recientes indican que la especificidad de este procedimiento puede incrementarse mediante incorporación de etapa de absorción 22F; retirando de este modo los anticuerpos de reacción cruzada de baja avidéz. Las medidas de IgG específicas de serotipo cuantitativas se hicieron por el Statens Serum Institut (SSI), Copenhage, Dinamarca, usando un ELISA que incorpora la etapa de absorción 22F. SSI se blindaron con respecto a asignación de tratamiento.

Parámetro secundario de eficacia y análisis de respuesta de anticuerpos

10 Medir la cantidad cuantitativa de anticuerpos anticapsulares específicos serotípicos no da información alguna de la funcionalidad de los anticuerpos. Esto se puede medir por un ensayo opsonofagocítico de citometría de flujo y da información indirecta de la capacidad de los anticuerpos opsonizando y facilitando la matanza de neumococos invasores.

15 El análisis cualitativo se realizó usando un ensayo opsonofagocítico de citometría de flujo que mide actividad funcional (opsonofagocítica) (OPA) de los anticuerpos específicos de serotipo. Brevemente: Se hacen ocho diluciones dobles en tampón de OPA a partir de 10 µl de suero de prueba. Una alícuota de 20 µl bien de bacterias múltiples o bien de suspensión de perlas múltiples que contiene 1×10^5 de cada uno de los serotipos o bien de perlas conjugadas a polisacáridos neumocócicas se añade a cada pocillo y la placa se incuba durante una hora a 37 °C con agitación horizontal (200 rpm). Después de esto, se añaden 20 µl de suero estéril a partir de suero de conejo bebé de 3 a 4 semanas de edad (Pel-Freez, Brown Deer, Wis.) a cada pocillo salvo para pocillos control de células HL60, que reciben 20 µl de tampón OPA. Después de incubación a 37 °C durante 20 min con agitación (200 rpm sobre un agitador orbital), se añadieron a cada pocillo 30 µl de leucocitos polimorfonucleares HL60 lavados (PMN) (2,5 µ 104/ml), dando como resultado una proporción efector-a-objetivo de 1:4 (para cada tipo de objetivo). El volumen de pocillo final es 80 µl, con primer pocillo de una serie de diluciones conteniendo una dilución final de 1:8.

25 La placa se incuba después durante 60 min con agitación al 37 °C. Se añaden 80 µl de tampón de OPA adicionales a cada pocillo proporcionando volumen suficiente para análisis citométrico y los contenidos de pocillo se transfirieron a tubos de microvaloración (Bio-Rad, Hércules, Calif.). Se pueden ensayar por placa hasta 12 muestras de suero, incluyendo una muestra de control de calidad. El análisis de flujo se hizo por Flow Applications, Inc, Ill, USA51.

Transporte neumocócico

30 La vacunación neumocócica puede afectar al transporte faríngeo de neumococos. La colonización faríngea neumocócica puede afectar también a la respuesta inmunitaria a la vacunación neumocócica. Por lo tanto, es importante establecer el estatus del vehículo antes y después de vacunación neumocócica. La colonización orofaríngea se ha investigado en la faringe posterior usando un frotis de cultivo BBL (Becton Dickson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EE.UU.) a través de la cavidad oral. Las muestras se marcaron con el número

35 identificador del estudio de los individuos, se congeló a -20 °C en pocas horas y más tarde se mandaron al Statens Serum Institut, donde tuvieron lugar el aislamiento, el cultivo y el serotipado. Esto ha tenido lugar en el día 0 y de nuevo durante el seguimiento en el día 270.

Acontecimientos adversos (ae):

40 Un AE es cualquier aparición médica perjudicial en un sujeto de investigación clínico, asociada temporalmente con el uso de un producto medicinal, se considere o no relacionado con el producto medicinal.

Un AE puede por lo tanto ser cualquier signo desfavorable y no deseado (incluyendo un hallazgo de laboratorio anormal), síntoma o enfermedad asociada temporalmente con el uso de un producto medicinal.

En este estudio un AE se ha graduado de acuerdo con los Criterios de Toxicidad Frecuentes, versión 2.0.

Definición de acontecimientos adversos graves (aag):

45 Un acontecimiento adverso que ocurre durante un ensayo es cualquier experiencia indeseable asociada con el uso de un producto médico en un participante. El acontecimiento es grave y será comunicado a la autoridad regular cuando el resultado del participante es:

1. Muerte

2. Peligro para la vida

50 3. Hospitalización (inicial o prolongada)

4. Discapacidad

5. Requerir intervención para evitar deterioro o daño permanente

6.Trastorno congénito/anomalía (para mujeres embarazadas)

Definición de reacción de acontecimiento adverso grave inesperado sospechado (SUSAR):

Una reacción adversa grave inesperada sospechada (SUSAR) tuvo lugar durante el estudio y debe comunicarse:

- El acontecimiento debe ser una SAE.

- 5 • Debe haber un cierto grado de probabilidad de que el acontecimiento sea una reacción adversa al fármaco administrado.

La reacción adversa debe ser inesperada, es decir, no prevista en el Folleto del Investigador (para un producto medicinal no autorizado).

Evaluación de datos: criterios para evaluación de objetivos

- 10 Todos los criterios de valoración se han comparado entre el grupo de la vacuna experimental (+ CpG 7909) y el grupo de vacuna control (+ placebo).

Un subestudio comparó los criterios de valoración en los dos grupos de tratamiento (no aleatorizados) (en HAART frente a sin HAART).

Criterios principales de valoración:

- 15 *A los seis meses después de la 2ª vacunación con Prevenar.*

- Los individuos de respuesta elevada a la vacuna neumocócica se definieron según incrementos de dos veces y niveles de IgG ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ para al menos 5 de 7 serotipos neumocócicos (por medidas de IgG cuantitativas)

Criterios secundarios de valoración:

Inmunogenicidad

- 20 *A los tres meses después de la 1ª vacunación con Prevenar.*

- Los individuos de respuesta elevada a la vacuna neumocócica se definieron según incrementos de dos veces y niveles de IgG ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ para al menos 5 de 7 serotipos neumocócicos (por medidas de IgG cuantitativas)

- Actividad opsonofagocítica para serotipos 6B, 14, 19F y 23F expresados como valoraciones

- 25 • Respuesta de anticuerpos específica de serotipo se define como incremento de 2 veces en niveles de IgG y niveles de IgG ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$

- La respuesta de anticuerpos específica de serotipos se definió como cambio en niveles de IgG

A seis meses después de la 2ª vacunación con Prevenar.

- Actividad opsonofagocítica para serotipos 6B, 14, 19F y 23F expresados como valoraciones

- 30 • Respuesta de anticuerpos específica de serotipo se define como incremento de 2 veces en niveles de IgG y niveles de IgG ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$

- La respuesta de anticuerpos específica de serotipos se definió como cambio en niveles de IgG

A un mes después de la vacunación con Pneumo Novum.

- Los individuos de respuesta elevada a la vacuna neumocócica se definieron según incrementos de dos veces y niveles de IgG ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ para al menos 5 de 7 serotipos neumocócicos (por medidas de IgG cuantitativas)

- 35 • Actividad opsonofagocítica para serotipos 6B, 14, 19F y 23F expresados como valoraciones

- Respuesta de anticuerpos específica de serotipo se define como incremento de 2 veces en niveles de IgG y niveles de IgG ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$

- La respuesta de anticuerpos específica de serotipos se definió como cambio en niveles de IgG

- 40 • Concentraciones de anticuerpos de media geométrica con el inmunoensayo de enzima estándar para serotipos 1, 4, 7F, 9V, 14, 18C y 19F

Colonización faríngea

En seis meses después de la 2ª vacunación con Prevenar.

- Número de individuos con colonización neumocócica

Predictores de respuesta de anticuerpos

En la línea base.

- 5 • Factores de riesgo para respuesta vacunal a los seis meses después de la segunda vacunación con Prevenar,
Criterios secundarios de valoración:

Reactogenicidad y seguridad en todos los sujetos

Poblaciones de análisis:

Población de seguridad: todos los pacientes que recibieron al menos una vacunación.

- 10 • Aparición de síntomas generales y solicitados durante el periodo de 4 días (día 0 a día 3) después de cada dosis de vacunación
- Aparición de síntomas no deseables hasta 1 mes después de cada vacunación
 - Cambios en el recuento de CD4 y en la carga vírica durante el estudio

- 15 La seguridad se evaluó por examen físico, acontecimientos adversos (según los criterios de toxicidad comunes versión 2.0), pruebas de laboratorio y parámetros de control del VIH (ARN de VIH y recuento de CD4).

Análisis estadísticos

Características de línea base

Las diferencias entre los grupos de estudio en el día 0 serán valoradas por la prueba de sumas de rangos Mann-Whitney (variables continuas) y por la prueba de Chi-cuadrado (variables dicotómicas y categóricas).

- 20 Criterios principales de valoración

Las proporciones de prevalencia de individuos de respuesta elevada a los seis meses después de la segunda vacunación con Prevenar, comparando los dos grupos de esquema de vacunación (con/sin CpG 7909), se han estimado por la prueba de Chi-cuadrado. Se planea un modelo de regresión de Poisson ajustado por edad, recuento de células CD4 en la línea base y HAART (en HAART frente a sin HAART) en la línea base.

- 25 Criterios secundarios de valoración

La comparación de los criterios de valoración entre los grupos de estudio se ha hecho por prueba de Chi-cuadrado. Se planea una regresión de Poisson (criterios de valoración dicotómicos) o una regresión lineal (criterios de valoración continuos), ajustada para factores de confusión potenciales apropiada.

- 30 Los factores de riesgo para lograr una respuesta de vacunación elevada (clasificada como un individuo de respuesta elevada) a los seis meses después de la segunda vacunación con Prevenar se estimarán por regresión de Poisson multivariable.

Datos de seguridad

Los datos de seguridad se han enumerado y comparado por prueba de Chi-cuadrado.

Tamaño de muestra estimado

- 35 Población con intención de tratar (ITT): todos los participantes distribuidos al azar

El tamaño de la muestra se calculó para el resultado final principal (proporciones de prevalencia de individuos de respuesta elevada después de segunda vacunación con Prevenar, comparando los dos grupos de esquema de vacunación). Ajustar las probabilidades de error de Tipo I y error de Tipo II para:

- Probabilidad de error de Tipo I (α) = 0,05 (bilateral).
- 40 • Probabilidad de error de Tipo II (β) = 0,20 (energía = $1 - \beta = 0,80$).
- Criterio de valoración principal: Proporción de individuos que responden de forma elevada a la vacuna (definidos como los que presentan incremento de 2 veces en niveles de IgG y niveles de IgG $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ a al menos 5 de 7 serotipos neumocócicos).

• N es el número de participantes necesario en cada grupo.

	Control\CpG	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70
	0,20	39	29	23	18	15
5	0,25	58	41	31	24	19
	0,30	93	61	42	31	24
	0,35	170	96	62	43	31
	0,40	388	173	97	62	42

10 Asumiendo una prevalencia del 30 % en el grupo de vacuna control y una prevalencia del 60 % en el grupo de
vacuna experimental se requiere un tamaño de muestra de 42 pacientes por grupo para detectar una diferencia en
prevalencia estimada por regresión de Poisson. El porcentaje de abandono del grupo esperado se ajusta al 10 %.
Así, se necesitaron en el estudio un total de 94 sujetos. De acuerdo con la aproximación recomendada por las
autoridades reguladoras, se ha calculado el intervalo de confianza (IC) del 95 % bilateral de la diferencia de
15 respuesta inmunitaria.

Ejemplo 2: Inmunogenicidad y seguridad de vacunas neumocócicas coadyuvadas por TLR9 en adultos infectados por el VIH. Resultados del ensayo distribuido al azar, de doble ciego, controlado por placebo

Se realizó el ensayo clínico descrito en el ejemplo 1.

20 El estudio fue un ensayo de fase II controlado por placebo que distribuye personas con VIH al azar para vacunarse
con dosis dobles de PCV (vacuna conjugada de neumococo) (Pevnar) ± 1 mg de CpG 7909 a los 0 y 3 meses y con
una dosis única de PPV (vacuna polisacarídica neumocócica) ± 1 mg de CpG 7909 a los 9 meses. La
inmunogenicidad y la seguridad se evaluaron a los 0, 3, 4, 9 y 10 meses. Una variable principal fue la proporción de
individuos que responden de forma elevada a la vacuna definidos según incremento de dos veces de niveles de IgG
25 y niveles de IgG ≥ 1 µg/ml para al menos 5 de 7 serotipos de PCV (las medidas cuantitativas de IgG se hicieron por
ELISA, Statens Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca) a los 9 meses.

Resultados: Como se indica en la tabla 1, se incluyeron 96 participantes. En cada grupo de 48 participantes, 38
estaban sometidos a tratamiento.

Tabla 1. Características de línea base en el momento de la inclusión.

		Grupo placebo	Grupo CpG
n		48	48
Sexo	Masculino	39 (79,2)	43 (89,6)
	Femenino	10 (20,8)	5 (10,4)
Raza	Caucásica	43 (89,6)	47 (97,9)
	No caucásica	5 (10,4)	1 (2,1)
Edad media, años (IQR)		48,9 (42,0-59,0)	48,9 (43,0-58,8)

30

(continuación)

		Grupo placebo	Grupo CpG
Recuento de células CD4+ medio por ml x10 ⁶ (IQR)		617 (500-848)	673 (393-817)
En HAART			
	Sí	38 (79,2)	39 (79,2)
	No	10 (20,8)	10 (20,8)
Logaritmo medio de ARN de VIH, IQR			
	En HAART	1,60	1,60
	Sin HAART	4,47 (3,73-4,86)	4,25 (3,70-4,59)
Inmunización anterior*	PPV-23	1 (2,1)	2 (4,2)
Fumador actual		17 (35,4)	18 (37,5)

*>5 años antes de la inclusión. IQR : intervalo intercuartil.

5 Como se indica en la tabla 3 y en la figura 1, la proporción de individuos que responden de forma elevada a la vacuna fue significativamente más alta en el CpG que en el grupo placebo coadyuvante (48,8 % frente a 25,0 %, p = 0,018) tras la inmunización con PVC. Las respuestas incrementadas se observaron también en 3 (51,1 % frente a 39,6 %, p = 0,26), 4 (77,3 % frente a 56,3 %, p = 0,033), y 10 (87,8 % frente a 51,1 %, p < 0,001) meses.

Tabla 3. Proporción de individuos de respuesta elevada a la vacuna en cada punto temporal.

N (%)		Grupo de placebo	Grupo de CPG	p
HR PRE PCV1	Sí	0	0	
	No	0	0	
HR 3 meses tras PCV1	Sí	19 (39,6)	24 (51,1)	0,26
	No	29 (60,4)	23 (48,9)	
HR 1 mes tras PCV2	Sí	27 (56,3)	34 (77,3)	0,03
	No	21 (43,7)	10 (22,7)	
HR 6 meses tras	Sí	12 (25,0)	21 (48,8)	0,02
	No	36 (75,0)	22 (51,2)	
HR 1 mes tras PPV-23	Sí	24 (51,1)	36 (87,8)	<0,001
	No	23 (48,9)	5 (12,2)	

HR: individuos de respuesta elevada --definidos como los que presentan incremento de 2 veces en niveles de IgG y niveles de IgG $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ para al menos 5 de 7 serotipos neumocócicos (por medidas cuantitativas de IgG); PCV: vacuna conjugada neumocócica; PPV-23 : vacuna polisacáridica neumocócica 23-valente.

10 Las figuras 2 y 3 muestran la diferencia en la respuesta de IgG relativa para dos serotipos PCV (9v y 14) entre el CPG y el grupo placebo.

Las figuras 4 y 5 muestran la respuesta a IgG relativa para los dos serotipos que no son PCV (1 y 7f) en el CPG y en el grupo placebo (según se esperaba no se observó ningún incremento en IgG en relación con inmunización de PCV). Tras la inmunización con PPV, ambos grupos (+/- CpG) muestran respuestas significativas. Sin embargo, CpG no incrementó la respuesta de anticuerpos a serotipos no de PCV (1 y 7f) después de inmunización con PPV.

- Como se indica en la tabla 4 (páginas 37-38), los datos sobre media geométrica de concentraciones (GMC) de los anticuerpos IgG revelaron proporciones de GMC crecientes a partir de la línea base para los meses 3, 4, 9 y 10 para casi todos los serotipos PCV-7 para el grupo experimental comparado con el grupo control. Como se esperaba la GMC de los 3 serotipos que no son de PCV (1, 7F y 19A) no varió significativamente tras inmunización con PCV-7.
- 5 Después de PPV-23 ambos grupos experimentaron un incremento de 2-5 veces en GMC para serotipos que no eran de PCV-7 (menor para serotipo 19A), pero no hubo diferencias de grupo significativas en proporciones de GMC.

Tabla 4: media geométrica de las concentraciones de anticuerpos IgG y media geométrica de las valoraciones de OPA de personas con VIH que reciben vacunas neumocócicas con o sin CPG 7909.

Serotipos de PCV-7	Grupo	Pre 1º PCV-7		Post 2º PCV-7		Pre PPV-23		Post PPV-23	
		Proporción de GM	GM	Proporción de GM	GM	Proporción de GM	GM	Proporción de GM	GM
PS 4-IgG	CPG 7909	0.53 (0.26-0.81)	1.35 (0.95-1.90)	1.00 (0.72-1.39)	2.26 (1.65-3.10)	1.00 (0.72-1.39)	1.86 (1.34-2.57)	1.00 (0.72-1.39)	1.86 (1.34-2.57)
	Control	0.39 (0.32-0.49)	1.26 (0.90-1.77)	0.71 (0.53-0.96)	1.48 (1.09-2.00)	0.71 (0.53-0.96)	1.45 (1.07-1.96)	1.40 (0.91-2.16)	1.45 (1.07-1.96)
PS 6B-IgG	CPG 7909	1.03 (0.82-1.31)	2.84 (1.96-4.12)	3.55 (2.47-5.12)	7.55 (5.05-11.3)	3.55 (2.47-5.12)	5.21 (3.64-7.46)	3.55 (2.47-5.12)	5.21 (3.64-7.46)
	Control	1.23 (0.94-1.64)	3.05 (2.01-4.62)	2.62 (1.71-4.01)	5.00 (3.19-7.85)	2.62 (1.71-4.01)	4.07 (2.66-6.24)	1.36 (0.77-2.38)	4.07 (2.66-6.24)
PS 6B-OPA	CPG 7909	8 (6-9)	66 (45-96)	268 (195-370)	268 (187-384)	268 (195-370)	556 (399-774)	268 (195-370)	556 (399-774)
	Control	8 (6-19)	82 (64-124)	276 (200-379)	184 (136-248)	276 (200-379)	505 (377-674)	0.97 (0.62-1.52)	505 (377-674)
PS 9V-IgG	CPG 7909	0.50 (0.42-0.60)	2.48 (1.71-3.58)	1.83 (1.30-2.58)	3.69 (2.65-5.15)	1.83 (1.30-2.58)	3.50 (2.59-4.72)	1.83 (1.30-2.58)	3.50 (2.59-4.72)
	Control	0.70 (0.51-0.97)	2.22 (1.52-3.25)	1.41 (0.97-2.07)	2.71 (1.91-3.86)	1.41 (0.97-2.07)	2.63 (1.85-3.74)	1.30 (0.78-2.15)	2.63 (1.85-3.74)
PS 14-IgG	CPG 7909	1.92 (1.43-2.57)	9.54 (6.40-14.2)	7.31 (4.33-9.18)	10.03 (6.84-14.7)	7.31 (4.33-9.18)	9.76 (7.16-13.3)	0.83 (0.48-1.42)	10.1 (6.96-14.7)
	Control	2.38 (1.67-3.39)	9.99 (6.31-15.8)	0.90 (0.51-1.56)	11.2 (7.43-16.8)	0.90 (0.51-1.56)	10.1 (6.96-14.7)	0.83 (0.48-1.42)	10.1 (6.96-14.7)
PS 14-OPA	CPG 7909	37 (25-24)	343 (261-454)	617 (475-802)	351 (274-449)	617 (475-802)	538 (385-752)	617 (475-802)	538 (385-752)
	Control	32 (22-46)	342 (263-462)	576 (445-746)	318 (249-405)	576 (445-746)	339 (243-471)	1.07 (0.74-1.54)	339 (243-471)
PS 18C-IgG	CPG 7909	0.75 (0.61-0.93)	4.11 (2.89-5.85)	2.46 (1.75-3.74)	4.61 (3.33-9.18)	2.46 (1.75-3.74)	3.96 (3.05-5.14)	2.46 (1.75-3.74)	3.96 (3.05-5.14)
	Control	1.00 (0.76-1.30)	4.59 (3.20-6.60)	0.94 (0.60-1.49)	4.88 (3.50-6.80)	0.94 (0.60-1.49)	3.91 (2.88-5.30)	0.87 (0.54-1.40)	3.91 (2.88-5.30)
PS 19F-IgG	CPG 7909	1.38 (1.12-1.71)	3.10 (2.36-4.07)	2.89 (2.19-3.81)	4.79 (3.64-6.30)	2.89 (2.19-3.81)	5.57 (4.40-7.05)	2.89 (2.19-3.81)	5.57 (4.40-7.05)
	Control	2.09 (1.62-2.70)	4.52 (3.37-6.05)	0.91 (0.62-1.35)	5.24 (3.95-6.96)	0.91 (0.62-1.35)	6.30 (4.59-8.63)	0.93 (0.63-1.38)	6.30 (4.59-8.63)
PS 19F-OPA	CPG 7909	25 (15-39)	428 (306-601)	204 (142-293)	329 (255-426)	204 (142-293)	701 (530-926)	204 (142-293)	701 (530-926)
	Control	20 (13-32)	359 (250-510)	205 (147-286)	242 (186-314)	205 (147-286)	551 (385-789)	1.00 (0.61-1.61)	551 (385-789)
PS 23F-IgG	CPG 7909	0.69 (0.57-0.83)	2.76 (1.94-3.94)	3.36 (2.43-4.65)	6.81 (4.89-9.48)	3.36 (2.43-4.65)	5.14 (3.91-6.76)	3.36 (2.43-4.65)	5.14 (3.91-6.76)
	Control	0.75 (0.61-0.92)	3.82 (2.52-5.79)	1.16 (0.68-1.98)	5.88 (3.85-9.00)	1.16 (0.68-1.98)	4.09 (2.85-5.89)	1.13 (0.68-1.88)	4.09 (2.85-5.89)
PS 23F-OPA	CPG 7909	13 (10-17)	107 (72-160)	244 (184-323)	196 (147-260)	244 (184-323)	362 (246-533)	244 (184-323)	362 (246-533)
	Control	11 (8-13)	132 (89-194)	205 (154-273)	173 (129-232)	205 (154-273)	245 (171-351)	1.19 (0.80-1.77)	245 (171-351)

(continuación)

Serotipos no PCV-7 ^a	Grupo	Pre 1º PCV-7	Proporción de GM	Post 1º PCV-7	Proporción de GM	Post 2º PCV-7	Proporción de GM	Pre PPV-23	Proporción de GM	Post PPV-23	Proporción de GM
PS 1-IgG	CPG 7909	0.43 (0.34-0.54)		0.38 (0.30-0.47)		0.37 (0.30-0.47)		0.37 (0.28-0.49)		1.68 (1.18-2.39)	
	Control	0.48 (0.39-0.59)	0.88 (0.65-1.19)	0.47 (0.39-0.57)	0.80 (0.60-1.06)	0.43 (0.37-0.50)	0.87 (0.66-1.15)	0.51 (0.40-0.65)	0.73 (0.51-1.03)	2.29 (1.61-3.27)	0.73 (0.45-1.20)
PS 7F-IgG	CPG 7909	0.78 (0.58-1.05)		0.56 (0.42-0.74)		0.46 (0.34-0.62)		0.57 (0.40-0.82)		2.72 (1.74-4.25)	
	Control	0.92 (0.72-1.19)	0.85 (0.58-1.24)	0.70 (0.54-0.90)	0.80 (0.54-1.16)	0.66 (0.53-0.84)	0.70 (0.48-1.00)	0.60 (0.46-0.77)	0.96 (0.63-1.47)	2.94 (2.08-4.16)	0.92 (0.53-1.60)
PS 19A-IgG	CPG 7909	1.55 (1.19-2.02)		2.10 (1.54-2.87)		2.58 (1.85-3.60)		1.82 (1.31-2.53)		4.09 (2.76-6.07)	
	Control	1.73 (1.27-2.35)	0.90 (0.60-1.34)	2.34 (1.69-3.24)	0.90 (0.68-1.40)	2.81 (1.95-4.05)	0.92 (0.56-1.50)	1.86 (0.56-1.50)	0.98 (0.60-1.60)	4.69 (3.00-7.33)	0.87 (0.48-1.58)

Los participantes se inmunizaron con dosis dobles de PCV-7 (Prenar® Wyeth) ± CPG 7909 a 0 y 3 meses seguidos por PPV-23 en dosis individual (Pneumo Noxum® Sanofi-Pasteur MSD), ± 1 mg de CPG 7909 a 9 meses. a Todos incluidos en PPV-23. OPA : actividad opsonofacética; PS: serotipo neumocócico; Proporción de GM: proporción de media geométrica ; PCV-7 : vacuna conjugada neumocócica 7-valente; PPV-23: vacuna polisacáridica neumocócica 23-valente.

Como se muestra en la tabla 2, en el grupo de CpG fueron más comunes reacciones sistémicas y en el sitio de inyección moderadas a PCV (100 % frente al 81,3 %, $p = 0,002$). Se observaron síntomas similares a la gripe en el grupo CpG después de PPV.

5 No tuvieron lugar efectos adversos en el recuento de células CD4+ (véase figura 6) ni en las funciones de órganos que tuvieron lugar en cada grupo.

Tabla 2: acontecimientos adversos relacionados con la inyección

	Primera			Segunda			PPV-23		
	PVC	PVC + p	PCV	PCV	PCV + p	PCV	PPV-23	PPV-23 + p	CPG
n (%)	n = 48	n = 47	n = 48	n = 44	n = 47	n = 41			
Al menos un acontecimiento adverso	33 (68,8)	44 (93,6)	30 (62,5)	40 (90,9)	0,001	28 (59,6)	41 (100)	<0,001	
Dolor en el sitio de inyección	32 (66,7)	43 (91,5)	30 (62,5)	37 (84,1)	0,02	27 (57,5)	36 (87,8)	0,002	
Eritema en el sitio de inyección	3 (6,3)	10 (21,3)	5 (10,4)	11 (25,0)	0,07	7 (14,9)	25 (61,0)	<0,001	
Hematoma en el sitio de inyección	6 (12,5)	18 (38,3)	7 (14,6)	16 (36,4)	0,02	9 (19,2)	27 (65,9)	<0,001	
Picor en el sitio de inyección	0 (0)	1 (2,1)	0 (0)	1 (2,3)	0,48	0 (0)	3 (7,3)	0,10	
Sintomas similares a gripe*	3 (6,3)	17 (36,2)	3 (6,3)	17 (38,6)	<0,001	2 (4,3)	37 (90,2)	<0,001	
Dolor de cabeza	2 (4,2)	1 (2,1)	0 (0)	0 (0)	1,00	0 (0)	5 (5,7)	0,02	
Náuseas	2 (4,2)	1 (2,1)	0 (0)	1 (2,3)	0,48	1 (2,1)	0 (0)	1,00	

*Los síntomas similares a la gripe incluyeron pirexia, artralgia, escalofríos y fatiga.

Conclusiones: en una población conocida por ser de respuesta baja a inmunización la adición de CPG 7909 a una vacuna neumocócica conjugada potencia enormemente la proporción de personas que presentan respuesta elevada a vacunas.

5 La seguridad de CPG 7909 y vacuna neumocócica conjugada (Pevnar) fue buena y no se observaron efectos adversos en las funciones orgánicas o en la progresión de la enfermedad del VIH durante el ensayo. La combinación de CPG 7909 y vacuna neumocócica conjugada (Pevnar) se toleró bien y los acontecimientos adversos fueron reacciones de sitio de inyección moderados y síntomas similares a los de la gripe moderados. En este ensayo, CPG 7909 no pareció incrementar la respuesta a serotipos no de Pevnar tras la vacunación polisacáridica neumocócica.

10 **Ejemplo 3: El coadyuvante de agonista TLR9 induce memoria celular en respuesta a vacuna conjugada neumocócica en adultos infectados con VIH.**

Los inventores presentes examinaron como CPG 7909 afectó la memoria celular en respuesta a vacuna conjugada neumocócica.

15 Procedimientos: Las células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) a partir de 40 individuos infectados con el VIH del la fase Ib/IIa controlada por placebo de doble ciego del ensayo de Ejemplo 1 (20 sujetos en cada grupo) se recogieron en los meses 0 a 4 y se almacenaron (congeladas).

20 Las PBMC congeladas se descongelaron y se pusieron a prueba en su viabilidad y se transfirieron a placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos. Las células se incubaron durante toda una noche a 37°C y se estimularon al día siguiente con polisacárido neumocócico purificado (serotipo (ST) 6B y 14). Después de la incubación de 48 horas, los sobrenadantes se recogieron y las concentraciones de citoquinas se midieron con Luminex. La respuesta relativa se calculó como la proporción entre las concentraciones de citoquinas post- y pre-inmunización, teniendo en cuenta la inmunidad pre-existente a *Streptococcus pneumoniae*, así como eliminando el sesgo del reconocimiento innato.

25 Resultados: Como se muestra en las figuras 7, 8 y 9, un mes después de que la segunda vacuna conjugada neumocócica el grupo CPG 7909 tuvo una respuesta de citoquinas relativamente más alta que el grupo coadyuvante de placebo para IFN-gamma (ST6B): 1,22 frente a 0,82, p = 0,004; (ST14): 1,21 frente a 0,89, p = 0,04; TNF-alfa (ST6B): 1,49 frente a 0,82, p = 0,03; (ST14): 1,76 frente a 0,85, p = 0,01; IL-6 (ST6B): 2,11 frente a 0,83, p = 0,0084; (ST14): 1,64 frente a 0,81, p = 0,0357), IFN-alfa (ST6B): 1,55 frente a 0,84, p = 0,0014; (ST14): 1,43 frente a 0,90, p = 0,0466). Las respuestas de citocinas en el grupo CPG 7909 comparado con el grupo control estuvieron también significativamente incrementadas observadas para IL-1B, IL-2R, MIP-1alfa, MIP-beta, MCP-1 y IP-10.

30 Conclusión: los resultados de los inventores muestran que entre la gente con VIH, un coadyuvante de agonista TLR9 co-administrado con la vacuna de conjugado neumocócico indujo la memoria celular a polisacáridos neumocócicos que no se observó cuando la vacuna se administró sola.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Coley Pharmaceutical Group, Inc.
- <120> Vacuna neumocócica y usos de la misma
- <130> Documento PC33894
- 40 <150> Documento US 61/174,068
- <151> 30/4/2009
- <150> Documento US 61/238.313
- 45 <151> 2009-08-31
- <160> 40
- <170> PatentIn versión 3.3
- 50 <210> 1
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 55 <220>
- <223> Oligonucleótido CpG de clase A
- <400> 1

ggggacgacg tcgtggggg 20
 <210> 2
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase A
 10 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(3)
 15 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (16)..(21)
 <400> 2
 20 ggggacgacg tcgtggggg g 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase B
 30 <400> 3
 tcgtcgtttt tcggtcgtt t 21
 <210> 4
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase B
 40 <400> 4
 tcgtcgtttt tcggtcgtt t 21
 <210> 5
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Oligonucleótido CpG de clase B
 <400> 5
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 55 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase B
 <400> 6
 tcgtcgtttc gtcgtttgt cgtt 24
 65 <210> 7

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase B

<400> 7
 tcgtcgtttt gtcgttttt tcga 24

10 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase B

<220>
 20 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(21)

<400> 8
 tcgtcgtttt tcggtgcttt t 21

25 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase B

<220>
 35 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(21)

<400> 9
 tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

40 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase B

<220>
 50 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(24)

<400> 10
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

55 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase B

<220>
 65 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(24)

<400> 11
tcgctgttc gtcgtttgt cggt 24

5 <210> 12
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido CpG de clase B

<220>
<221> Enlace fosforotioato
15 <222> (1)..(24)

<400> 12
tcgctgtttt gtcgttttt tcga 24

20 <210> 13
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido CpG de clase C

<400> 13
tcgctgtcgtt cggcgcgcgcg cg 22

30 <210> 14
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido CpG de clase C

<400> 14
40 tcgctgacgt tcggcgcgcg ccg 23

<210> 15
<211> 21
<212> ADN
45 <213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido CpG de clase C

50 <400> 15
tcggacgttc ggcgcgccc g 21

<210> 16
<211> 19
55 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido CpG de clase C

60 <400> 16
tcggacgttc ggcgcccg 19

<210> 17
65 <211> 20
<212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C
 5
 <400> 17
 tcgctcgtt cggcgcgccc 20
 <210> 18
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido CpG de clase C
 <400> 18
 tcgacgttcg gcgcgcgccc 20
 <210> 19
 20 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido CpG de clase C
 <400> 19
 30 tcgacgttcg gcgcgccc 18
 <210> 20
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C
 <400> 20
 40 tcgctcgtt cggcgcgccc 18
 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C
 50 <400> 21
 tcgcgacgtt cggcgcgccc cg 22
 <210> 22
 <211> 22
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C
 60 <400> 22
 tcgtcgtttt cggcgcgccc cg 22
 <210> 23
 65 <211> 22
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C
 5
 <400> 23
 tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22
 <210> 24
 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido CpG de clase C
 <400> 24
 tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24
 <210> 25
 20 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido CpG de clase C
 <400> 25
 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cgt 23
 30 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C
 <220>
 40 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(2)
 <220>
 45 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (3)..(4)
 <220>
 50 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (8)..(11)
 <220>
 55 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (17)..(22)
 <400> 26
 60 tcgcgtcggt cggcgcgcgc cg 22
 <210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C

5 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(2)

10 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (3)..(5)

15 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (6)..(8)

20 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (9)..(12)

25 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (13)..(17)

30 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (18)..(23)

35 <400> 27
 tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23

40 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C

50 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(2)

55 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (3)..(6)

60 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (7)..(10)

65 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (11)..(15)

70 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (16)..(21)

75 <400> 28
 tcggacgttc ggcgcgcgcc g 21

80 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C

5 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(2)

10 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (3)..(6)

15 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (7)..(10)

20 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (11)..(19)

20 <400> 29
 tcggacgttc ggcgcgccg 19

25 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C

35 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(2)

35 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (3)..(4)

40 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (5)..(7)

45 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (8)..(11)

50 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (12)..(20)

50 <400> 30
 tcgcgtcgtt cggcgcgccg 20

55 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C

65 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(2)

<220>

<221> Enlace fosforotioato
 <222> (3)..(5)

<220>
 5 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (6)..(9)

<220>
 10 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (10)..(14)

<220>
 15 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (15)..(20)

<400> 31
 tcgacgttcg gcgcgcccg 20

<210> 32
 20 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Oligonucleótido CpG de clase C

<220>
 30 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(2)

<220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (3)..(5)

35 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (6)..(9)

<220>
 40 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (10)..(18)

<400> 32
 45 tcgacgttcg gcgcgcccg 18

<210> 33
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C

<220>
 55 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(2)

<220>
 60 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (3)..(4)

<220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (5)..(7)

65 <220>

<221> Enlace fosforotioato
 <222> (8)..(11)

<220>
 5 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (12)..(18)

<400> 33
 tcgctgctgtt cggcgccg 18

10 <210> 34
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C

<220>
 20 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(2)

<220>
 25 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (3)..(4)

<220>
 30 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (5)..(7)

<220>
 35 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (8)..(11)

<220>
 40 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (12)..(16)

<220>
 45 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (17)..(22)

<400> 34
 tcgcgacgtt cggcgcgcg cg 22

50 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 55 <223> Oligonucleótido CpG de clase C

<220>
 60 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(22)

<400> 35
 tcgtcgtttt cggcgcgcg cg 22

65 <210> 36
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido CpG de clase C
 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 5 <222> (1)..(22)
 <400> 36
 tcgtcgtttt cggcgccgc cg 22
 10 <210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C
 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 20 <222> (1)..(5)
 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (6)..(12)
 25 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (13)..(18)
 30 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (19)..(24)
 <400> 37
 35 tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24
 <210> 38
 <211> 23
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase C
 45 <220>
 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (1)..(2)
 <220>
 50 <221> Enlace fosforotioato
 <222> (3)..(23)
 <400> 38
 tcgtcgtttt cggcgccgc cgt 23
 55 <210> 39
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido CpG de clase P
 <400> 39
 65 tcgtcgacga tcggcgccgc ccg 23

<210> 40
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
5
<220>
<223> Oligonucleótido CpG de clase P

<220>
10 <221> Enlace fosforotioato
<222> (1)..(2)

<220>
15 <221> Enlace fosforotioato
<222> (3)..(5)

<220>
20 <221> Enlace fosforotioato
<222> (6)..(8)

<220>
<221> Enlace fosforotioato
<222> (9)..(12)
25
<220>
<221> Enlace fosforotioato
<222> (13)..(17)

<220>
30 <221> Enlace fosforotioato
<222> (18)..(23)

<400> 40
35 tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna neumocócica que comprende sacáridos de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugados individualmente a CRM197 y al menos un agonista de TLR-9 como coadyuvante, en la que dicho, al menos un, agonista de TLR-9 es un oligonucleótido de CpG que tiene la secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en: 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCCTTTT 3' (SEC ID N.º: 3), 5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTTT 3' (SEC ID N.º: 4), 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEC ID N.º: 5), 5' TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEC ID N.º: 6) y 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3' (SEC ID N.º: 7) para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades provocadas por infección por *S. pneumoniae* en un sujeto inmunodeprimido, en la que dicho sujeto inmunodeprimido padece de infección por VIH o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y se encuentra en terapia antirretroviral altamente activa (HAART).
2. La vacuna neumocócica para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho oligonucleótido de CpG está seleccionado del grupo que consiste en: 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T 3' (SEC ID N.º: 8) o 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T 3' (SEC ID N.º: 9) o 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEC ID N.º: 10) o 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEC ID N.º: 11) o 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*C*G*A 3' (SEC ID N.º: 12) en las que * se refiere a un enlace fosforotioato.
3. La vacuna neumocócica para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende de 0,2 a 10 mg de oligonucleótido CpG.
4. La vacuna neumocócica para su uso según las reivindicaciones 1-3, que comprende sacáridos a partir de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F conjugados individualmente con CRM197.
5. La vacuna neumocócica para su uso según las reivindicaciones 1-4, en la que la cantidad de conjugado en cada dosis de vacuna es de 2 a 100 µg.
6. La vacuna neumocócica para su uso según las reivindicaciones 1-5, que contiene cada sacárido capsular de *S. pneumoniae* en una dosis de entre 1-5 µg de sacárido.
7. La vacuna neumocócica para su uso según las reivindicaciones 1-6, que contiene tampón de cloruro de sodio y/o de succinato de sodio como excipientes.
8. La vacuna neumocócica para su uso según las reivindicaciones 1-7, que comprende alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio como coadyuvante adicional al, al menos un, coadyuvante agonista de TLR-9.
9. La vacuna neumocócica para su uso según las reivindicaciones 1 a 8, en la que el sujeto inmunodeprimido a vacunar es un ser humano adulto de 55 años o más de edad.

FIGURA 1

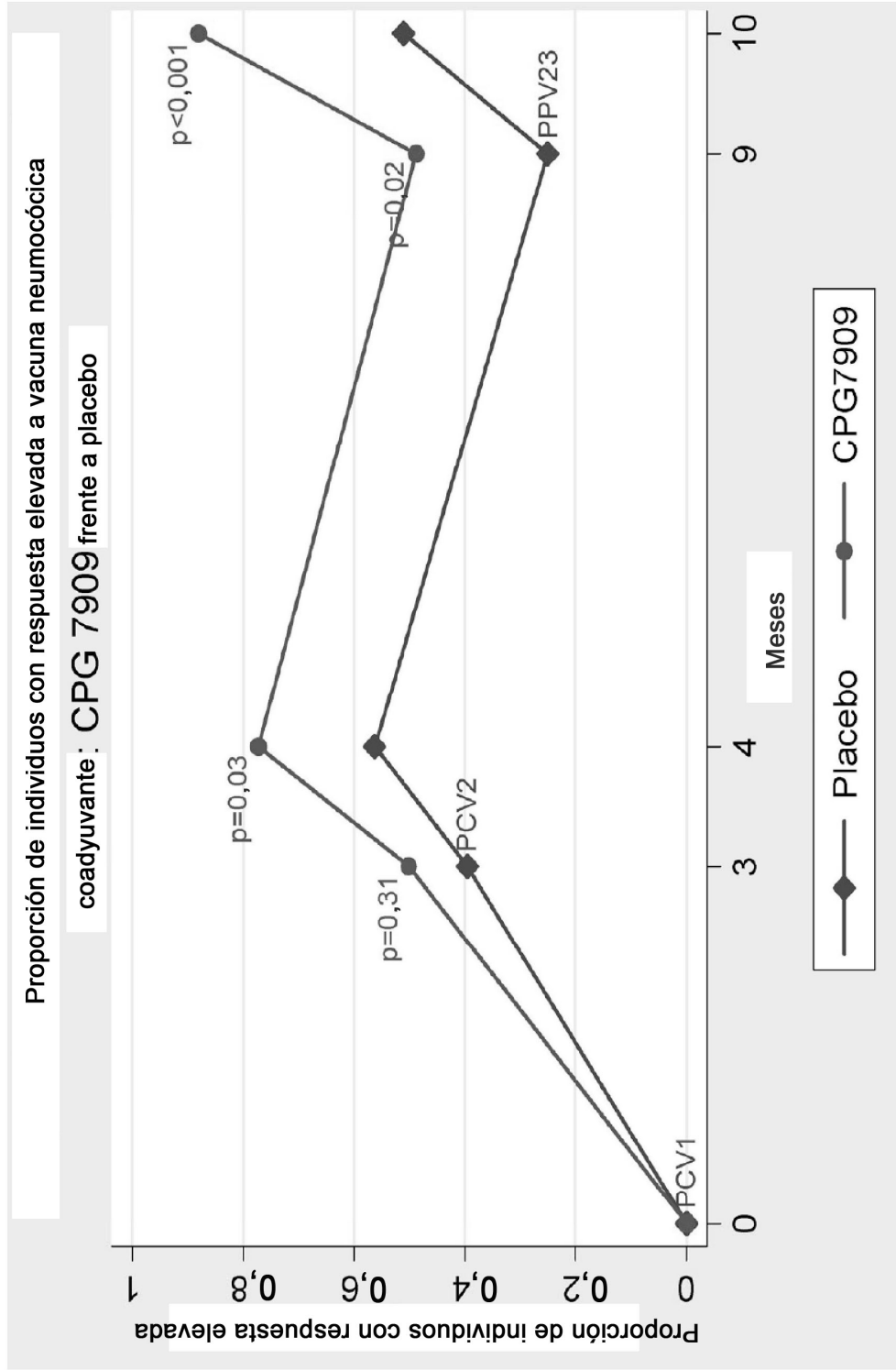


FIGURA 2

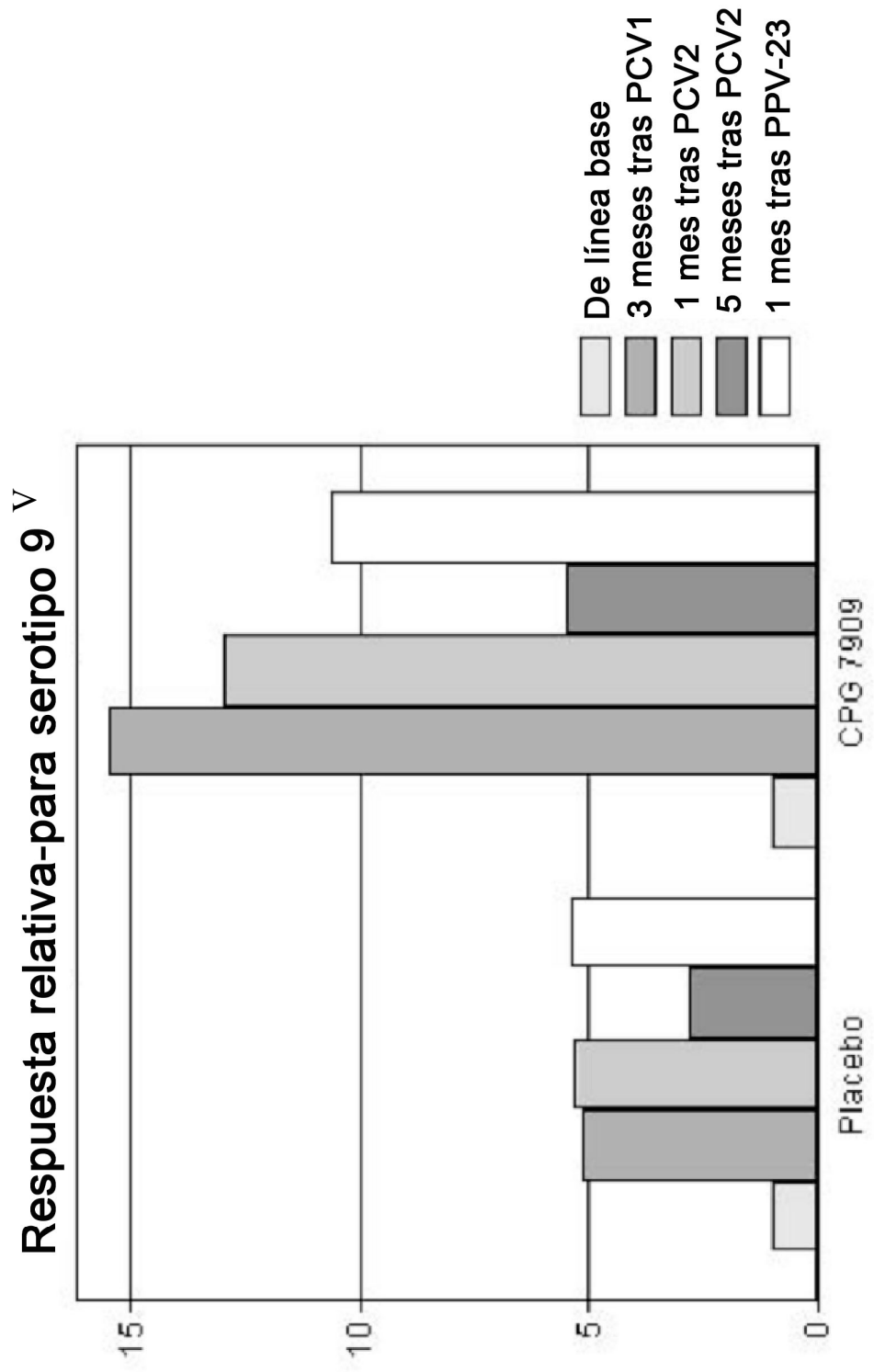


FIGURA 3

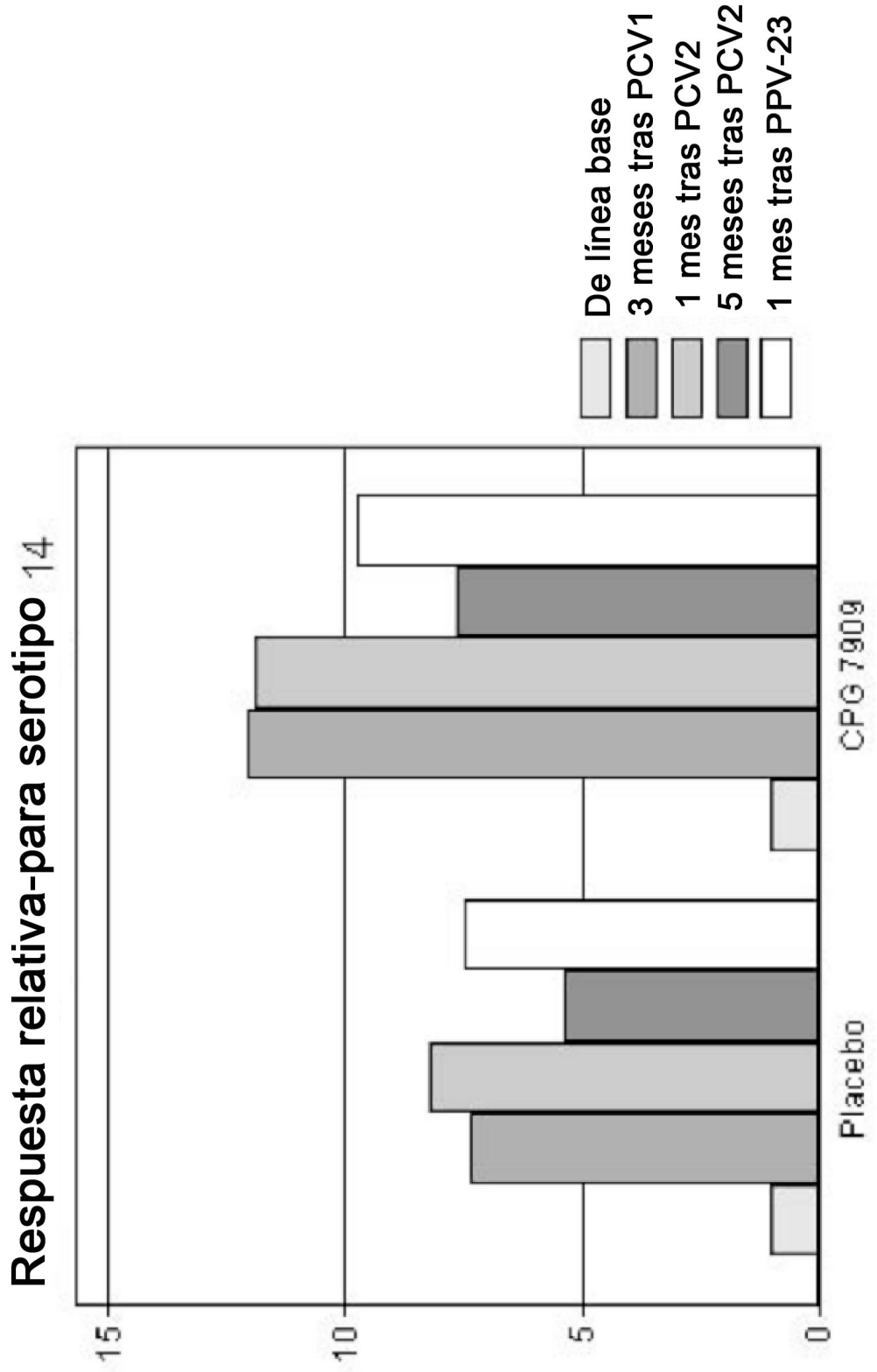


FIGURA 4

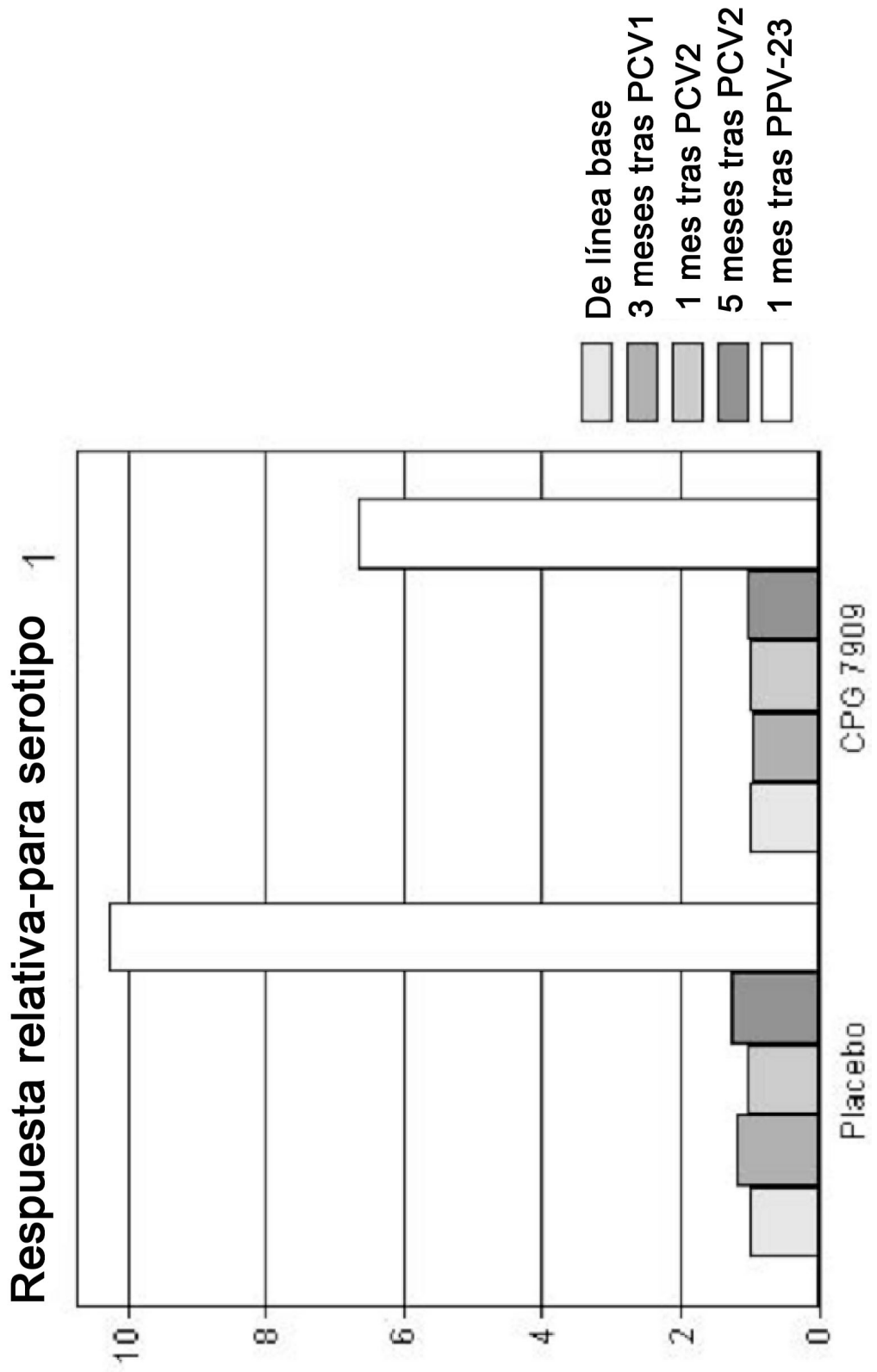


FIGURA 5

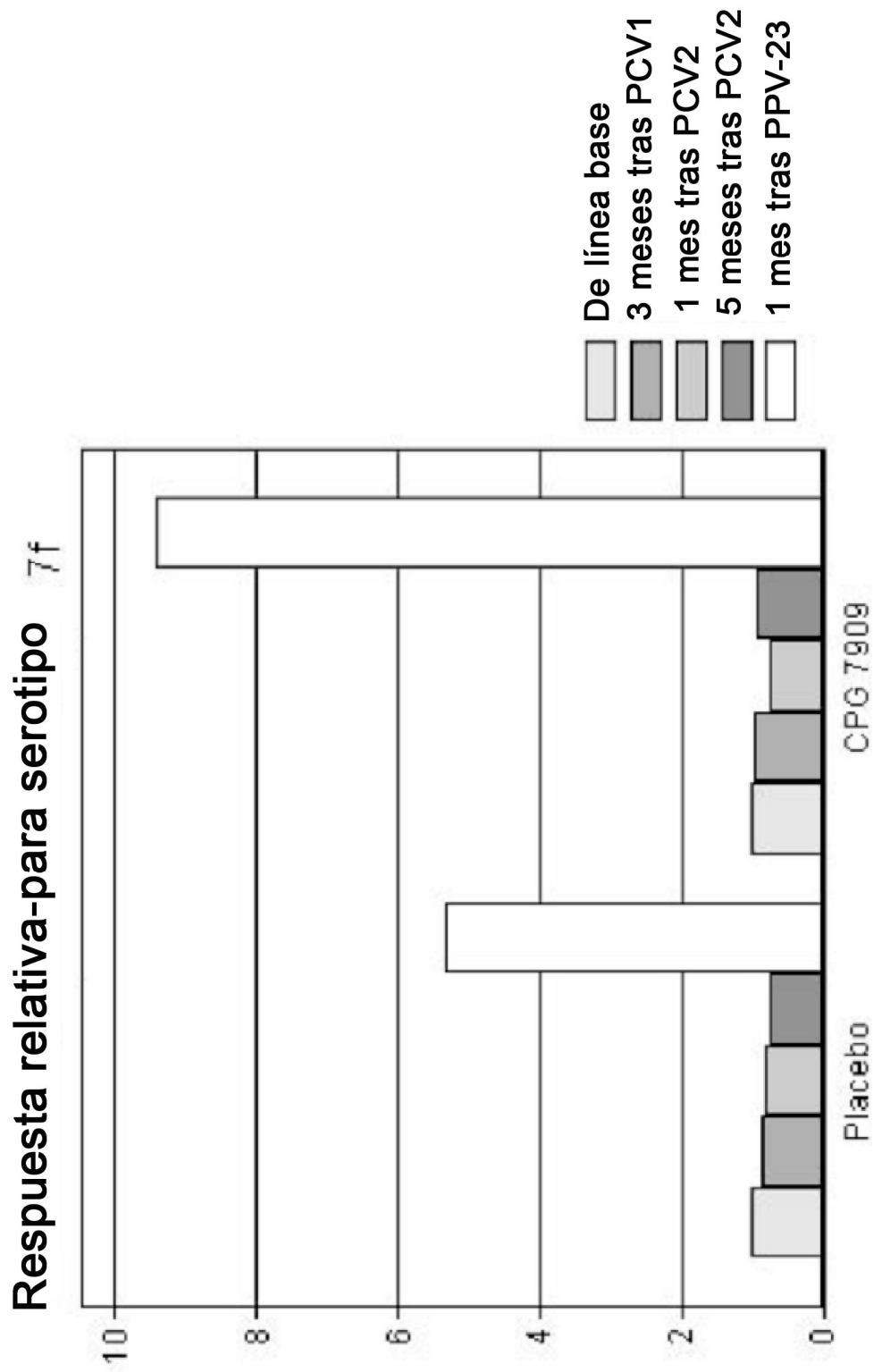


FIGURA 6

Cambio en recuentos de células CD4+ a partir de la línea base durante el estudio

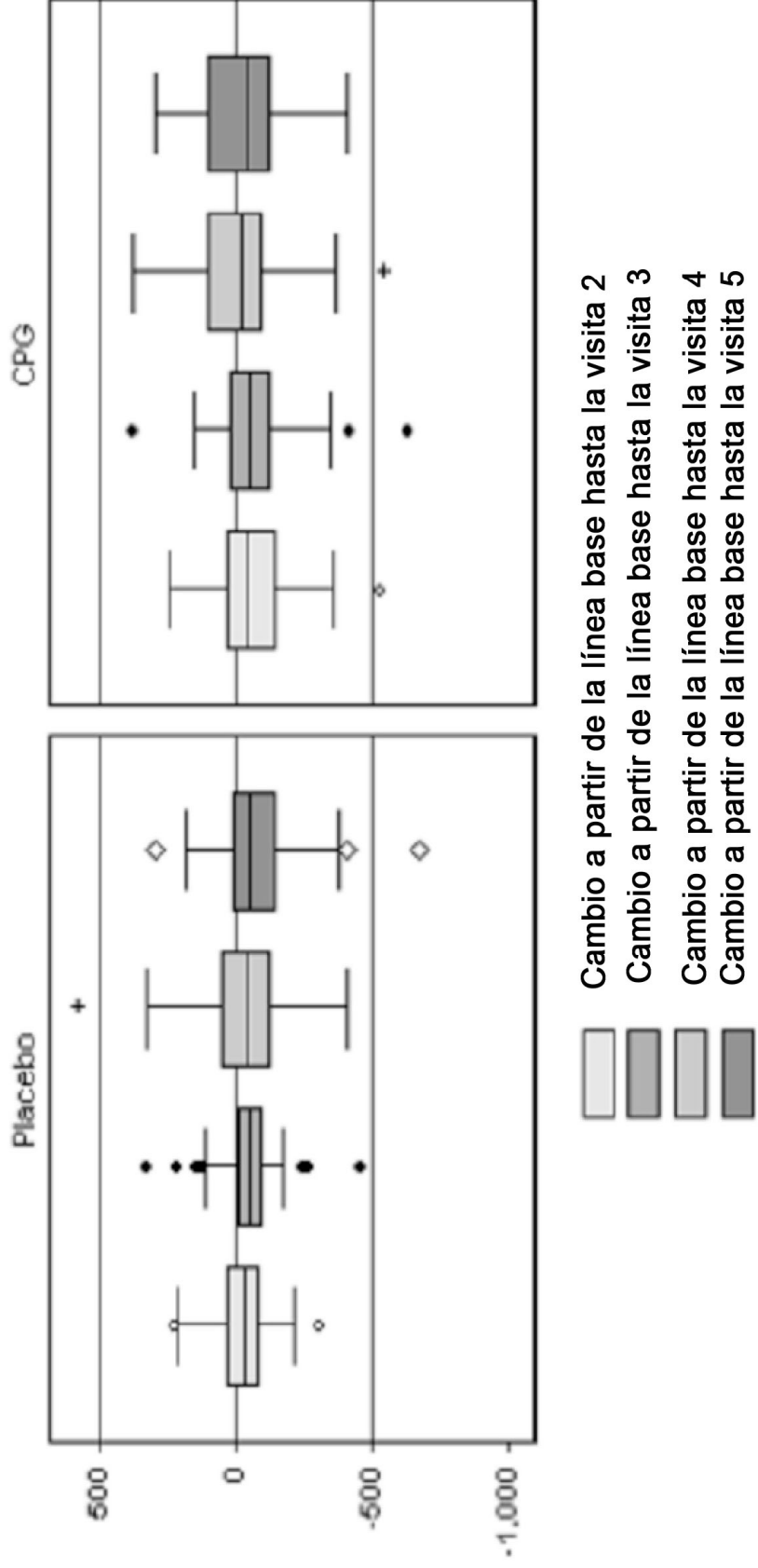


FIGURA 7

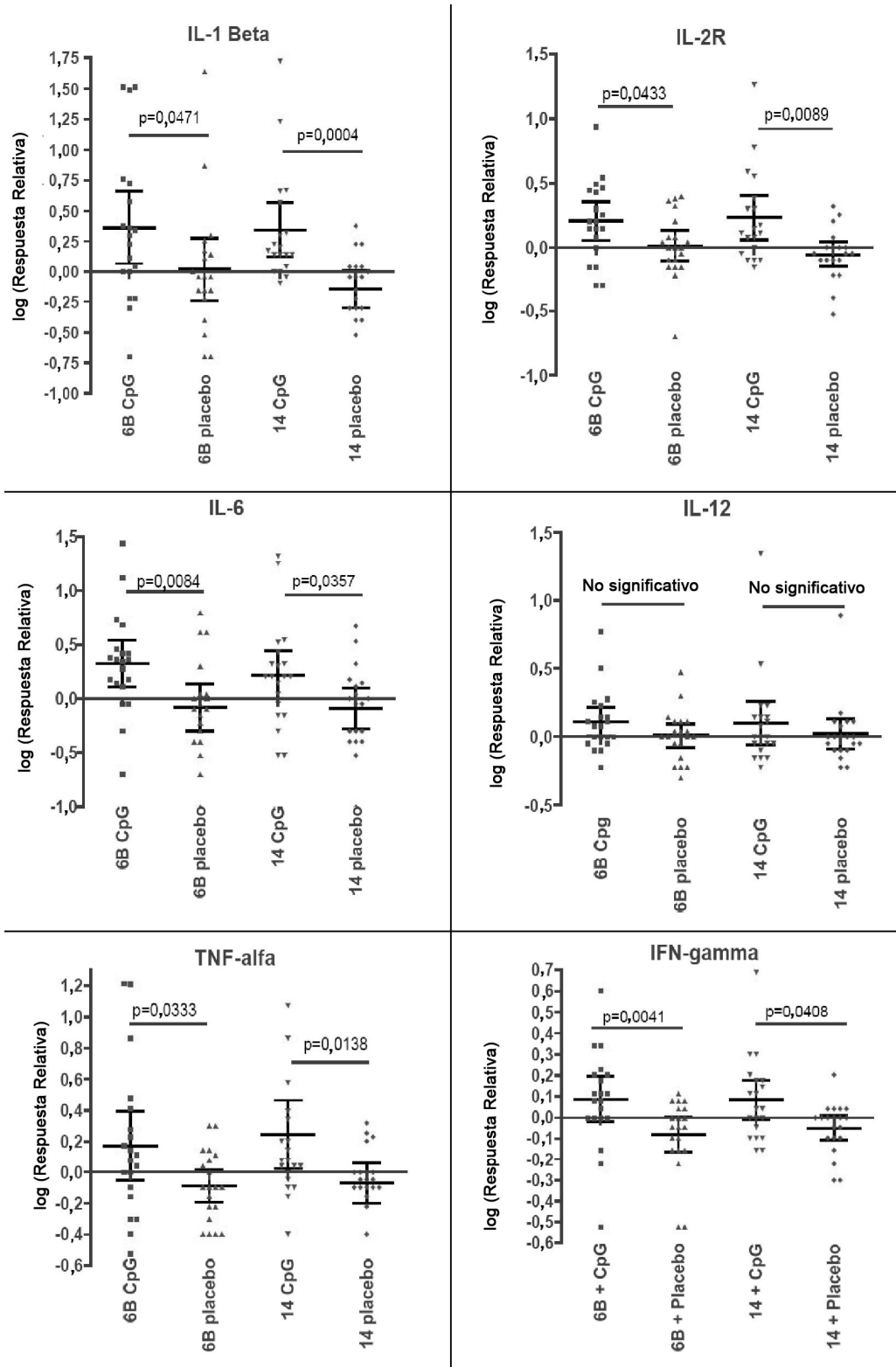


FIGURA 8

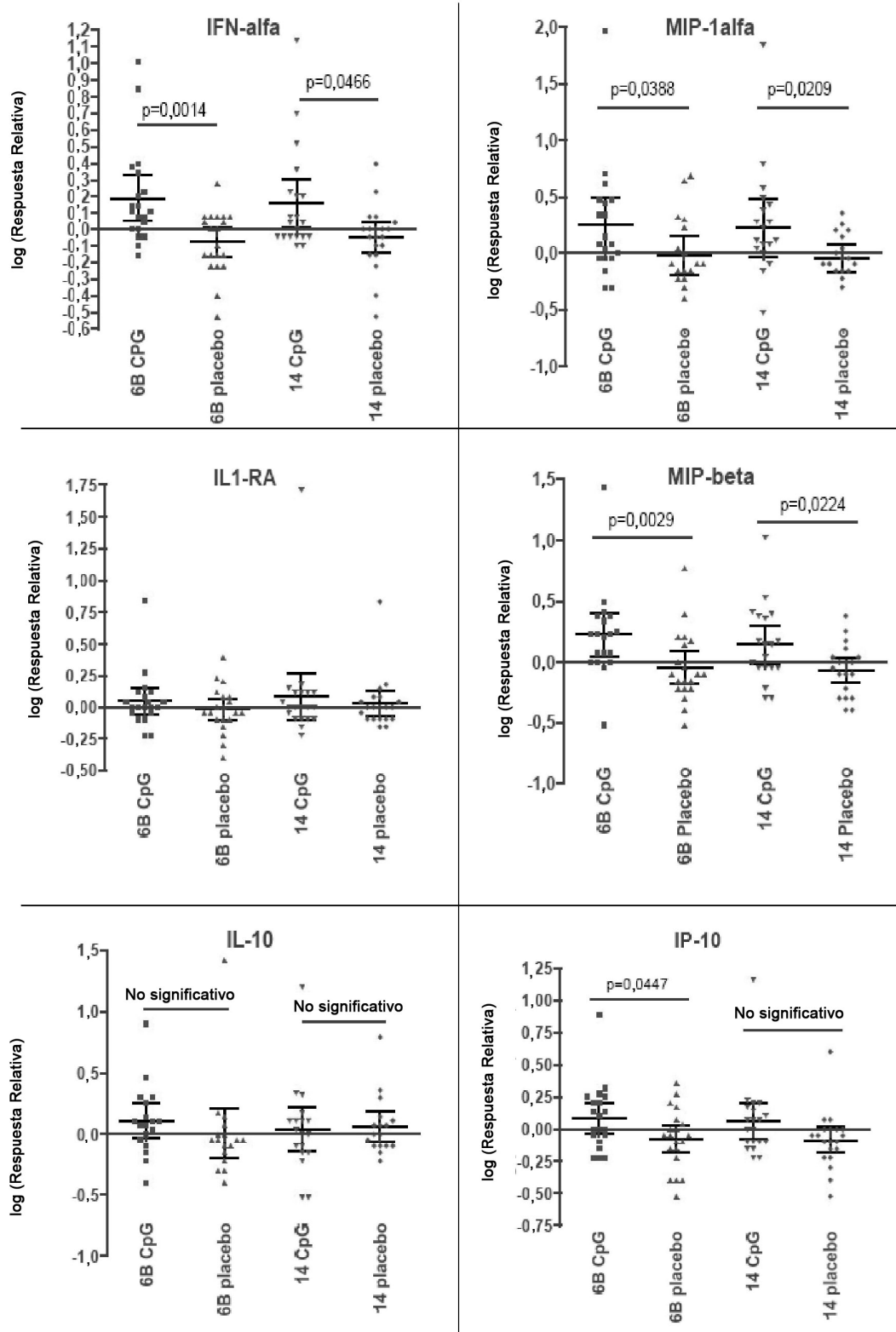


FIGURA 9

