

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 259**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2002 E 09075006 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2189165**

54 Título: **Solubilización de polisacárido capsular y vacunas de combinación**

30 Prioridad:

20.06.2001 GB 0115176

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

06.06.2016

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

COSTANTINO, PAOLO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 573 259 T3

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

DESCRIPCIÓN

Solubilización de polisacárido capsular y vacunas de combinación

Campo técnico

5 La presente invención pertenece al campo de las vacunas, particularmente contra infección y enfermedad por meningococos.

Antecedentes de la técnica

10 *Neisseria meningitidis* es un patógeno humano Gram negativo. Coloniza la faringe, causando meningitis y ocasionalmente, septicemia en ausencia de meningitis. Está muy relacionado con *N. gonorrhoeae*, aunque una característica que diferencia claramente el meningococo es la presencia de una cápsula polisacárida que está presente en todos los meningococos patogénicos.

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

Los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* se preparan típicamente por un procedimiento que comprende las etapas de precipitación del polisacárido (por ejemplo, usando un detergente catiónico), fraccionamiento con etanol, extracción con fenol frío (para retirar la proteína) y ultracentrifugación (para retirar LPS) [por ejemplo, ref. 1].

20 Se ha conocido durante muchos años [2, 3] una vacuna tetravalente de polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, Y y W135 y ha obtenido licencia para uso humano. Aunque es eficaz en adolescentes y adultos, induce una mala respuesta inmunitaria y corta duración de protección y no puede usarse en bebés [por ejemplo, 4]. Esto se debe a que los polisacáridos son antígenos independientes de linfocito T que inducen una débil respuesta inmunitaria que no puede reforzarse. Los polisacáridos en esta vacuna no están conjugados y están presentes en una relación 1:1:1:1 [5]. MENCEVAX ACWY™ contiene 50 µg de cada polisacárido purificado una vez reconstituido a partir de su forma liofilizada.

25 Los oligosacáridos conjugados de serogrupo C se han aprobado para uso humano [por ejemplo, Menjugate™; ref. 6]. Sigue existiendo, sin embargo, una necesidad de mejoras en vacunas conjugadas contra los serogrupos A, W135 e Y, y en su fabricación.

Divulgación de la invención

30 La invención proporciona un procedimiento para purificar y conjugar un polisacárido capsular bacteriano, a una proteína vehículo, de acuerdo con la reivindicación 1. El conjugado puede usarse para preparar vacunas conjugadas, en particular contra *Haemophilus influenzae* tipo B.

Precipitación y solubilización en etanol

35 Se conocen en la técnica muchas técnicas para precipitar polisacáridos solubles. Los procedimientos de la presente invención usan uno o más detergentes catiónicos. El detergente incluye bromuro de cetiltrimetilamonio ('CTAB') [8]. CTAB también es conocido como bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de cetrimonio, Cetavlon y Centimida. Otros detergentes incluían bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio.

Los polisacáridos capsulares se liberan en el medio durante cultivo. Por consiguiente, el material de partida para la precipitación típicamente será el sobrenadante de un cultivo bacteriano centrifugado o será un cultivo concentrado.

40 La etapa de precipitación puede ser selectiva para los polisacáridos, pero típicamente también coprecipitará otros componentes (por ejemplo, proteínas, ácido nucleico, etc.).

El polisacárido precipitado puede recogerse por centrifugación antes de la solubilización.

45 Después de la precipitación, el polisacárido (típicamente en forma de un complejo con el detergente catiónico) se solubiliza usando disolvente de etanol A que es relativamente selectivo para el polisacárido, que se usa para minimizar los contaminantes (por ejemplo, proteínas, ácido nucleico, etc.). Se ha descubierto que el etanol es ventajoso a este respecto, y es muy selectivo para el complejo CTAB-polisacárido.

El etanol se añade al polisacárido precipitado para dar una concentración final de etanol (basada en el contenido total de etanol y agua) entre el 75 % y el 95 %. La concentración óptima final de etanol puede depender del serogrupo de la bacteria de la cual se obtiene el polisacárido.

50

El etanol puede añadirse al polisacárido precipitado en forma pura o puede añadirse en una forma diluida con un disolvente miscible (por ejemplo, agua). Mezclas preferidas de disolvente son mezclas de etanol:agua, con una relación preferida entre aproximadamente 70:30 y aproximadamente 95:50 (por ejemplo, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10).

5 En comparación con procedimientos convencionales para preparar polisacáridos capsulares, el proceso de dos etapas de precipitación seguido por extracción con etanol es más rápido y más simple.

10 En contraste con el procedimiento descrito en la ref. 9, el procedimiento usa detergente catiónico en lugar de detergente aniónico. A diferencia del procedimiento de la ref. 10, el polisacárido se resolubiliza usando etanol, en lugar de por intercambio catiónico usando sales de calcio o magnesio. A diferencia del procedimiento de la ref. 11, la precipitación no requiere un soporte poroso inerte. Además, a diferencia de los procedimientos de la técnica anterior, se usa alcohol para resolubilizar el polisacárido en lugar de precipitarlo.

El polisacárido capsular bacteriano habitualmente será de, *Haemophilus influenzae* tipo B, o 'Hib'.

Procesamiento adicional del polisacárido solubilizado

15 Después de la resolubilización, el polisacárido se trata adicionalmente para retirar los contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en que no es aceptable incluso una contaminación mínima (por ejemplo, para producción de vacunas humanas). Esto implicará una o más etapas de filtración.

La filtración es filtración por tamaño y/o ultrafiltración.

Una vez filtrado para retirar los contaminantes, el polisacárido puede precipitarse para tratamiento y/o procesamiento adicional. Esto puede conseguirse convenientemente por intercambio de cationes (por ejemplo, mediante la adición de sales de calcio o sodio).

20 El polisacárido puede modificarse químicamente. Por ejemplo, puede modificarse para reemplazar uno o más grupos hidroxilo con grupos bloqueantes.

25 El polisacárido (opcionalmente modificado) típicamente se hidrolizará para formar oligosacáridos. Esto se realiza preferentemente para dar un grado promedio final de polimerización (DP) en el oligosacárido de menos de 30. Se prefieren oligosacáridos a polisacáridos para su uso en vacunas. El DP puede medirse convenientemente por cromatografía de intercambio iónico o por ensayo de colorimetría [14].

Si se realiza hidrólisis, al hidrolizado generalmente se le ajusta el tamaño para retirar oligosacáridos de longitud corta. Esto puede conseguirse de diversos modos, tales como ultrafiltración seguida por cromatografía de intercambio iónico.

30 Para potenciar la inmunogenicidad, los polisacáridos u oligosacáridos de la invención se conjugan con un vehículo (Figura 18). La conjugación con proteínas vehículo es particularmente útil para vacunas pediátricas [por ejemplo, ref. 15] y es una técnica bien conocida [por ejemplo, revisado en las ref. 16 a 24, etc.).

La proteína vehículo es un toxoide diftérico CRM₁₉₇ [25, 26, 27].

Se prefieren conjugados con una relación sacárido:proteína (p/p) entre 0,5:1 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido), y aquellos con una relación entre 1:1,25 y 1:2,5 son más preferidos.

35 Una proteína vehículo individual puede portar múltiples sacáridos diferentes [39]. Los conjugados pueden usarse junto con proteína vehículo libre [40]

Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier enlazador adecuado si fuera necesario

40 El sacárido se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio [41, 42, etc.]). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 22.

45 Los enlaces mediante un grupo enlazador pueden hacerse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 43 y 44. Un tipo de enlace implica aminación reductora del polisacárido, acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo enlazador de ácido adípico, y después acoplamiento de una proteína al otro extremo del grupo enlazador de ácido adípico [20, 45, 46]. Otros enlazadores incluyen B-propionamido [47], nitrofeniletilamina [48], haluros de haloacilo [49], enlaces glucosídicos [50], ácido 6-aminocaproico [51], ADH [52], restos C₄ a C₁₂ [53] etc. Como alternativa al uso de un enlazador, puede usarse enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender oxidación del polisacárido seguido por aminación reductora con la proteína, como se describe en, por ejemplo, las referencias 54 y 55.

50 Se prefiere un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, por remplazo terminal = grupos o con -NH₂) seguido por derivatización con un diéster adípico (por ejemplo, N-hidroxisuccinimido

diéster de ácido adípico) y reacción con la proteína vehículo.

Después de la conjugación, pueden separarse los sacáridos libres y conjugados. Existen muchos procedimientos adecuados, incluyendo cromatografía hidrófoba ultrafiltración trangular, diafiltración etc. [véanse también las ref. 56 y 57, etc.].

5 **Mezclas y composiciones que comprenden los sacáridos**

Los conjugados de la invención pueden mezclarse con otras moléculas biológicas. Se prefieren mezclas de sacáridos de más de un serogrupo de *N. meningitidis*, por ejemplo, composiciones que comprenden sacáridos de los serogrupos A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, C+W135+Y, A+C+W135+Y, etc. Se prefiere que la eficacia protectora de los antígenos sacáridos individuales no se elimine combinándolos, aunque puede reducirse la inmunogenicidad real (por ejemplo, títulos ELISA).

10 Cuando se usa un sacárido de serogrupo C, este preferentemente tiene ~12 a ~22 unidades repetitivas.

Pueden conjugarse sacáridos de diferentes serogrupos de *N. meningitidis* a la misma o diferentes proteínas vehículo.

15 Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de ambos serogrupos A y C, se prefiere que la relación (p/p) de sacárido MenA:sacárido MenC sea mayor de 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor). Sorprendentemente, se ha observado inmunogenicidad mejorada del componente MenA cuando está presente en exceso (masa/dosis) al componente MenC.

20 Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares (por ejemplo, oligosacáridos) del serogrupo W135 y al menos uno de los serogrupos A, C e Y, se ha descubierto sorprendentemente que la inmunogenicidad del sacárido MenW135 es mayor cuando se administra en combinación con el sacárido del otro u otros serogrupos que cuando se administra solo (a la misma dosificación, etc.) [cf. ref. 58]. Por tanto, la capacidad del antígeno MenW135 de provocar una respuesta inmunitaria es mayor que la respuesta inmunitaria provocada por una cantidad equivalente del mismo antígeno cuando se suministra sin asociación con los antígenos de los otros serogrupos. Dicha inmunogenicidad potenciada puede determinarse administrando el antígeno MenW135 a animales de control y la mezcla a animales de ensayo y comparando los títulos de anticuerpo contra los dos usando ensayos convencionales tales como títulos bactericidas, radioinmunoensayo y ELISA etc. Vacunas que comprenden combinaciones sinérgicas de sacáridos del serogrupo W135 y otro serogrupos son inmunológicamente ventajosas. Permiten respuestas anti-W135 potenciadas y/o dosis inferiores de W135.

25 Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares del serogrupo Y y uno o ambos de los serogrupos C y W135, se prefiere que la relación (p/p) de sacárido MenY:sacárido W135 sea mayor de 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor) y/o que la relación (p/p) de sacárido MenY:sacárido MenC sea menor de 1 (por ejemplo, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, o inferior).

30 Relaciones preferidas (p/p) para sacáridos de los serogrupos A:C:W135:Y son: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2:1.

Las mezclas también pueden comprender proteínas. Se prefiere incluir proteínas del serogrupo B de *N. meningitidis* (por ejemplo, ref. 59 a 64) o preparaciones OMV [por ejemplo, ref. 65 a 68 etc.].

35 También pueden incluirse antígenos que no son de meningococos y no son de *Neisseria*, preferentemente los que no disminuyen la respuesta inmunitaria contra los componentes de meningococos. La ref. 69, por ejemplo, desvela combinaciones de oligosacáridos de *N. meningitidis* serogrupos B y C junto con el sacárido Hib. Se prefieren antígenos de neumococos, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, *B. pertussis*, difteria, tétanos, *Helicobacter pylori*, polio y/o *H. influenzae*. Antígenos no de *Neisseria* particularmente preferidos incluyen:

- 40 - antígenos de *Helicobacter pylori* tales como CagA [70 a 73], VacA [74, 75], NAP [76, 77, 78], HopX [por ejemplo, 79], HopY [por ejemplo, 79] y/o ureasa.
- un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, 80, 81, 82].
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como un virus inactivado [por ejemplo, 83, 84].
- 45 - un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o centrales [por ejemplo, 84, 85], estando preferentemente el antígeno de superficie adsorbido en un fosfato de aluminio [86].
- un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, 87], preferentemente no adsorbido o adsorbido en un fosfato de aluminio [88].
- un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo, 89].
- un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo 59 a 62].
- 50 - un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, ref. 90 a 96].
- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo, 97].
- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo, 98].
- uno o más antígenos de polio [por ejemplo, 99, 100] tales como IPV.
- uno o más antígenos de la rabia [por ejemplo 101] tal como virus inactivado liofilizado [por ejemplo, 102, RabAvert™].
- 55 - antígenos del sarampión, paperas y rubéola [por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de la ref. 103].
- uno o más antígenos de influenza [por ejemplo, capítulo 19 de la ref. 103], tal como las proteínas de superficie

hemaglutinina y/o neuraminidasa.

- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 104].
- un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [por ejemplo, 105, 106].
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [por ejemplo, 106, 107, 108].
- 5 - un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 109].
- uno o más antígenos de un paramixovirus tal como virus sincitial respiratorio (RSV [110, 111]) y/o virus de parainfluenza (PIV3 [112]).
- un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo, 113, 114, 115].
- un antígeno de un virus de la familia *flaviviridae* (género flavivirus), tal como del virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, cuatro serotipos de virus del Dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus del Nilo occidental.
- 10 - un antígeno de pestivirus, tal como del virus clásico de la fiebre porcina, virus de la diarrea vírica bovina, y/o virus de la enfermedad de la frontera.
- un antígeno de parvovirus, por ejemplo, de parvovirus B19.
- 15 - un toxoide tetánico [por ejemplo, ref. 116].
- holotoxina pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, ref. 117 y 118].
- antígeno pertussis celular.

20 La mezcla puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales que pueden destoxificarse cuando sea necesario (por ejemplo, destoxificación de toxina pertussis por medios químicos y/o genéticos).

Cuando se incluye un antígeno diftérico en la mezcla se prefiere también incluir antígeno tetánico y antígenos pertussis. Asimismo, cuando se incluye un antígeno tetánico se prefiere también incluir antígenos diftéricos y pertussis. Asimismo, cuando se incluye un antígeno pertussis se prefiere también incluir antígenos diftéricos y tetánicos.

25 Los antígenos en la mezcla típicamente estarán presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra ese antígeno.

30 Como alternativa al uso de antígenos proteicos en la mezcla, puede usarse el ácido nucleico que codifica al antígeno. Los componentes proteicos de la mezcla por tanto pueden remplazarse por ácido nucleico (preferentemente ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifica la proteína.

Vacunas multivalentes de sacárido

35 La solicitud también desvela vacunas y composiciones inmunogénicas que comprenden sacáridos capsulares de al menos dos (es decir, 2, 3 o 4) de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*, en las que dichos sacáridos capsulares se conjugan a una o más proteínas vehículo y/o son oligosacáridos. Cuando la vacuna tiene solamente dos oligosacáridos o polisacáridos conjugados de los serogrupos A, C, W135 e Y, estos preferentemente no son de los serogrupos A y C (cf. ref. 6, 119 y 120). Composiciones preferidas comprenden sacáridos de los serogrupos C e Y. Otras composiciones preferidas comprenden sacáridos de los serogrupos C, W135 e Y.

40 La solicitud desvela una composición inmunogénica que comprende un conjugado de oligosacárido de serogrupo A y un conjugado de oligosacárido de serogrupo C, y que comprende adicionalmente (i) un adyuvante de fosfato de aluminio o de hidróxido de aluminio y (ii) un tampón. Cuando la composición comprende un adyuvante de fosfato de aluminio, el tampón es preferentemente un tampón fosfato, cuando comprende un adyuvante de hidróxido de aluminio, el tampón es preferentemente un tampón histidina.

45 Cuando la vacuna comprende sacárido capsular del serogrupo A, se prefiere que el sacárido del serogrupo A se combine con el otro u otros sacáridos poco antes de su uso, para minimizar su hidrólisis (cf. sacáridos Hib). Esto puede conseguirse convenientemente teniendo el componente de serogrupo A en forma liofilizada y el componente o componentes de los otros serogrupos en forma líquida, usándose el componente líquido para reconstituir el componente liofilizado cuando está listo para su uso. El componente líquido preferentemente comprende un adyuvante de sal de aluminio, mientras que el componente de serogrupo A liofilizado puede comprender o no un adyuvante de sal de aluminio.

50 Por tanto, la solicitud desvela un kit que comprende: (a) sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo A, en forma liofilizada; y (b) uno o más sacáridos capsulares de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3) de *N. meningitidis* serogrupos C, W135 e Y, en forma líquida. Los sacáridos se conjugan preferentemente a una o más proteínas vehículo y/o son a oligosacáridos. El kit puede adoptar la forma de dos viales.

55 La solicitud también desvela un procedimiento para preparar una composición de vacuna de la invención, que comprende mezclar un sacárido capsular liofilizado de *N. meningitidis* serogrupo A con uno o más sacáridos capsulares de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3) de *N. meningitidis* serogrupos C, W135 e Y, en el que dicho uno o más sacáridos están en forma líquida.

La solicitud también desvela un kit que comprende: (a) oligosacárido capsular conjugado de *N. meningitidis* serogrupo A, en forma liofilizada; y (b) uno o más antígenos adicionales en forma líquida. El antígeno adicional puede estar conjugado o no al oligosacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C.

Composiciones inmunogénicas y vacunas

- 5 Los conjugados de la invención son particularmente adecuados para su inclusión en composiciones inmunogénicas y vacunas. Un procedimiento de la invención, por lo tanto, puede incluir la etapa de formular el conjugado como una composición inmunogénica o vacuna.

10 Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la invención típicamente comprenderán, además de los conjugados de *H. influenzae*, vehículos farmacéuticamente aceptables, que incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, trehalosa [121], agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas), y partículas de virus inactivo. Dichos vehículos son bien conocidos para los expertos en la materia. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. Está disponible un análisis minucioso de los excipientes farmacéuticamente aceptables en la ref. 122.

20 Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno sacárido, así como cualquier otro de los componentes mencionados anteriormente, según lo necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y estado físico del individuo a tratarse, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo de sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico que está tratando, de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté dentro de un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse a través de ensayos rutinarios. La dosificación de tratamiento puede ser un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis (por ejemplo, incluyendo dosis de refuerzo). La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

30 La vacuna puede incluir un adyuvante. Adyuvantes preferidos para potenciar la eficacia de la composición incluyen, aunque sin limitación: (1) sales de amonio (alumbre), tales como hidróxidos de aluminio (incluyendo oxihidróxidos), fosfatos de aluminio (incluyendo hidroxifosfatos), sulfato de aluminio, etc. [Capítulos 8 y 9 en la ref. 123]; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como muramil péptidos [los muramil péptidos incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE, etc.] o componentes de pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo, (a) MF59™ [Capítulo 10 en las ref. 123; 124, 125], que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 %, y Span 85 al 0,5 % (que contiene opcionalmente MTP-PE) formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidizador, (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4%, polímero L121 bloqueado con Pluronic al 5 %, y el thr-MDP microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado con vórtice para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande, y (c) sistema adyuvante Rib™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 %, y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared bacteriana (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (3) adyuvantes de saponina [capítulo 22 de la ref. 123], tales como QS21 o Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), en forma simple o en forma de partículas generadas a partir de las mismas tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores; capítulo 23 de la ref. 123), dichos ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional, por ejemplo, ref. 126; (4) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (5) citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [127], etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (6) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) por ejemplo, ref. 128 y 129, opcionalmente en ausencia sustancial de alumbre cuando se usa con sacáridos de neumococos, por ejemplo, ref. 130; (7) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua, por ejemplo, ref. 131, 132 y 133; (8) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG (Roman y col., Nat. Med., 1997, 3, 849-854; Weiner y col., PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis y col., J. Immunol., 1998, 160, 870-876; Chu y col., J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631; Lipford y col., Eur. J. Immunol., 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu y col., Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Krieg y col., Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman y col., PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballas y col., J. Immunol., 1996, 157, 1840-1845; Cowdery y col., J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575; Halpern y col., Cell. Immunol., 1996, 167, 72-78; Yamamoto y col., Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey y col., J. Immunol., 1996, 157, 2116-2122; Messina y col., J. Immunol., 1991, 147, 1759-1764; Yi y col., J. Immunol., 1996, 157, 4918-4925; Yi y col., J. Immunol., 1996, 157, 5394-5402; Yi y col., J. Immunol., 1998, 160, 4755-4761; y Yi y col., J. Immunol., 1998, 160, 5898-5906; solicitudes de patente internacional

- WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581) es decir, que contienen al menos un dinucleótido CG, usándose opcionalmente 5-metilcitosina en lugar de citosina; (8) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno, por ejemplo, ref. 134; (9) un tensioactivo de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol [135] o un tensioactivo de éter o éster alquílico de polioxietileno en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [136]; (10) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) [137]; (11) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica, por ejemplo, ref. 138; (12) una saponina y una emulsión de aceite en agua, por ejemplo, ref. 139; (13) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un estero) por ejemplo, ref. 140; (14) enterotoxina inestable al calor ("LT") de *E. coli*, o mutantes destoxificados de la misma, tales como los mutantes K63 o R72 [por ejemplo, Capítulo 5 de la ref. 141]; (15) toxina colérica ("CT"), o mutantes destoxificados de la misma [por ejemplo, Capítulo 5 de la ref. 141]; (16) liposomas [capítulos 13 y 14 de la ref. 123]; (17) quitosana [por ejemplo, ref. 142]; (18) ARN bicatenario; (19) micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 nm de diámetro, más preferentemente de ~200 nm a ~300 nm de diámetro, y mucho más preferentemente de ~500 nm a ~1000 nm de diámetro) firmadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, a poli(α-hidroxi ácido) tal como poli(lactida-co-glicolida), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona etc.), opcionalmente tratados para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB); o (20) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para potenciar la eficacia de la composición [por ejemplo, capítulo 7 de la ref. 123].
- 20 Se prefieren sales de aluminio (especialmente fosfatos y/o hidróxidos de aluminio) y MF59. Cuando se usa un fosfato de aluminio, es posible adsorber uno o más de los sacáridos en la sal de aluminio, pero se prefiere no adsorber los sacáridos a la sal, y esto se favorece incluyendo iones fosfato libres en solución (por ejemplo, mediante el uso de un tampón fosfato). Cuando se usa un hidróxido de aluminio, se prefiere adsorber los sacáridos a la sal. El uso de hidróxido de aluminio como adyuvante es particularmente ventajoso para el sacárido del serogrupo A.
- 25 Es posible en composiciones adsorber algunos antígenos a un hidróxido de aluminio pero que tengan otros antígenos en asociación con un fosfato de aluminio. Para combinaciones tetravalentes de serogrupo de *N. meningitidis*, por ejemplo, están disponibles las siguientes permutaciones:

Serogrupo	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)															
	P	H	P	H	H	H	P	P	P	H	H	H	P	P	P	H
A	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
C	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
W135	P	H	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	P	P	H	P
Y	P	H	H	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P	P

Para combinaciones trivalentes de serogrupo de *N. meningitidis*, están disponibles las siguientes permutaciones:

Serogrupo	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)							
C	P	H	H	H	P	P	P	H
W135	P	H	H	P	H	P	H	P
Y	P	H	P	H	H	H	P	P

- 30 Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a tratarse pueden ser animales; en particular, pueden tratarse sujetos humanos. Las vacunas son particularmente útiles para vacunar niños y adolescentes. Pueden suministrarse por vías sistémicas y/o a la mucosa.
- 35 Típicamente, las composiciones inmunogénicas se preparan como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de su inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas para efecto adyuvante potenciado. El suministro directo de las composiciones generalmente será parenteral (por ejemplo, por inyección, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular o suministrada al espacio intersticial de un sujeto). Las composiciones también pueden administrarse a una lesión. Otros modos de administración incluyen administración oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas y transcutáneas (por ejemplo, véase la ref. 143), agujas e vaporizador hipodérmico. La dosificación de tratamiento puede ser un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis (por ejemplo, incluyendo dosis de refuerzo).
- 40 Las vacunas de la invención son preferentemente estériles. Están preferentemente libres de pirógenos. Están tamponadas preferentemente, por ejemplo, entre pH 6 y pH 8, generalmente alrededor de pH 7. Cuando una vacuna comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón histidina [144].
- 45

Las vacunas de la invención pueden comprender detergente (por ejemplo, un Tween, tal como Tween 80) a niveles bajos (por ejemplo, <0,01 %). Las vacunas de la invención pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o trehalosa, por ejemplo, a aproximadamente 15 mg/ml, particularmente si tienen que liofilizarse.

5 Las dosis óptimas de los antígenos individuales pueden evaluarse empíricamente. En general, sin embargo, los antígenos sacáridos de la invención se administrarán a una dosis entre 0,1 y 100 µg de cada sacárido por dosis, con un volumen de dosificación típico de 0,5 ml. La dosis es típicamente entre 5 y 20 µg por sacárido por dosis. Estos valores se miden como sacárido.

Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad después de infección), pero típicamente serán profilácticas.

10 Los conjugados de la invención pueden usarse en un procedimiento para generar una respuesta inmunitaria en un paciente, que comprende administrar a un paciente una vacuna de acuerdo con la invención. La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular. El paciente es preferentemente un niño.

15 La invención también proporciona el uso de un conjugado de la invención en la fabricación de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria en un animal. El medicamento es preferentemente una composición inmunogénica (por ejemplo, una vacuna). El medicamento es preferentemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por *H. influenzae* (por ejemplo, otitis media, bronquitis, neumonía, celulitis, pericarditis, meningitis, etc.). Por tanto se prefiere la prevención y/o tratamiento de meningitis bacteriana.

Las vacunas pueden ensayarse en modelos animales convencionales (por ejemplo, véase la ref. 145).

20 *Definiciones*

La expresión "que comprende" significa "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 muestra el efecto de relaciones variables de etanol:agua sobre la solubilización de polisacáridos.

Las Figuras 2 a 4 muestran títulos de IgG obtenidos en ratones contra antígenos oligosacáridos: la Figura 2 muestra los resultados usando oligosacárido del serogrupo A; la Figura 3 muestra resultados para el serogrupo Y; y la Figura 4 muestra los resultados para el serogrupo W135.

30 La Figura 5 muestra títulos de IgG post-II obtenidos en ratones con una mezcla de conjugados de oligosacárido para los serogrupos A y C: la Figura 5a muestra las respuestas anti-serogrupo A; y la Figura 5b muestra las respuestas anti-serogrupo C.

Las Figuras 6 a 8 muestran los títulos de IgG obtenidos en ratones con una mezcla de conjugados de oligosacárido para los serogrupos C, W135 e Y: la Figura 6 muestra las respuestas anti-serogrupo W135; la Figura 7 muestra las respuestas anti-serogrupo Y; y la Figura 8 muestra las respuestas anti-serogrupo C.

35 Las Figuras 9 a 11 muestran los títulos de IgG post-II obtenidos en ratones con una mezcla de conjugados de oligosacárido para los serogrupos A, C, W135 e Y: la Figura 9 muestra las respuestas anti-serogrupo W135; la Figura 10 muestra las respuestas anti-serogrupo Y; y la Figura 11 muestra las respuestas anti-serogrupo A.

40 La Figura 12 es una curva de calibración obtenida usando muestras de ensayo de polisacárido MenA a diferentes tiempos de hidrólisis. La curva muestra la relación lineal entre el recíproco del grado de polimerización y la energía de rotación óptica.

La Figura 13 es una curva de calibración obtenida usando muestras de ensayo de polisacárido MenY a diferentes tiempos de hidrólisis. La curva muestra la relación lineal entre el log del grado de polimerización y KD (coeficiente de distribución).

45 Las Figuras 14 a 16 muestran los títulos de IgG post-II, divididos por subclase de IgG, obtenidos en ratones después de inmunización con conjugados de oligosacárido para los serogrupos: (14) A; (15) C; (16) W135 y (17) Y.

La Figura 17 muestra los títulos de IgG post-II, divididos por subclase de IgG, obtenidos en ratones después de inmunización con una mezcla tetravalente de conjugados de oligosacárido.

La Figura 18 ilustra la preparación de un conjugado de oligosacárido.

50

La Figura 19 muestra (A) GMT anti-MenA y (B) GMT anti-MenC (\pm intervalos de confianza del 95 %) obtenidos en un modelo de cobaya. Los valores por encima de las barras son títulos en ensayo bactericida en suero (SBA), es decir, el recíproco de la dilución en suero que produce el 50 % de eliminación.

Ejemplos de referencia

5 A. Producción y purificación de polisacáridos de meningococos

Se cultivaron meningococos de los serogrupos A, W135 e Y en matraces de 500 ml que contenían 150 ml de Franz A como medio, durante 12 horas a 35 ± 1 °C. La agitación se estableció a 150 rpm usando un agitador de deslizamiento de 35 mm. Después se inocularon 85 ml del cultivo en un fermentador de 20 l que contenía Watson como medio.

10 Después de 18,5 horas (W135 e Y) o 16,5 horas (A), cuando se alcanzó DO=10, se interrumpió la fermentación añadiendo 300 ml de formalina y después, tras 2 horas de incubación, se enfrió el fermentador hasta 10 °C. El sobrenadante se recogió por centrifugación seguido por filtración (0,22 μ m), y ultrafiltración con una membrana de 30 kDa.

15 El polisacárido concentrado en bruto después se precipitó por adición de CTAB como una solución en agua de 100mg/ml. Los volúmenes añadidos se muestran en la siguiente tabla. Después de 12 horas a temperatura ambiente, se recuperaron los complejos de CTAB por centrifugación. El complejo de CTAB se extrajo añadiendo una solución de etanol al 95 % a temperatura ambiente durante 16-20 horas en agitación vigorosa. El volumen de etanol añadido se muestra en la siguiente tabla:

Serogrupo	Volumen de CTAB (ml)	Volumen de etanol al 95 % (litros por kg de pasta húmeda)
A	475	3,5 a 6
W135	200	4 a 6
Y	650	3,4

20 Las suspensiones resultantes se filtraron a través de un filtro de profundidad CUNO 10 SP. El filtrado se hizo recircular a través de un cartucho CUNO zetacarbon™ hasta $DO_{275nm} < 0,2$. El filtrado de Zcarbon después se recogió y se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m. El polisacárido finalmente se precipitó en la fase de etanol por adición de una solución en agua de $CaCl_2$ 2M (10-12 ml/l de solución final de EtOH). Después se recogió el polisacárido purificado por centrifugación, se lavó con etanol al 95 % y se secó al vacío.

25 En otros experimentos, se varió la concentración final de etanol usada (Figura 1). Para polisacárido de serogrupo A, un intervalo entre el 80 y el 95 % de etanol fue más eficaz, disminuyendo la eficacia de extracción a porcentajes inferiores. Para el serogrupo W135, se consiguió buena extracción con etanol entre el 75 % y el 90 %, siendo el 95 % menos eficaz. Para el serogrupo Y, los mejores resultados se consiguieron con etanol entre el 75 % y el 85 %, siendo menos eficaces porcentajes mayores (por ejemplo, el 90 %, el 95 %). En general, se apreció que porcentajes de etanol por debajo de los informados en el presente documento tendían a aumentar la co-extracción de contaminantes tales como proteínas. Los porcentajes de etanol dados en este párrafo se expresan como una concentración final (etanol como porcentaje de volumen total de etanol + agua) y se basan en un contenido de agua de las pastas de CTAB-polisacárido recuperadas por centrifugación de aproximadamente el 50 % (es decir, 500 g de H_2O por kg de pasta húmeda). Este valor se determinó empíricamente en experimentos a pequeña escala.

35 B. Conjugación de polisacáridos de serogrupo A

a) Hidrólisis

40 Se hidrolizó el polisacárido de meningococos de serogrupo A en tampón acetato sódico 50 mM, pH 4,7 durante aproximadamente 3 horas a 73 °C. La hidrólisis se controló para obtener polisacáridos con un grado promedio de polimerización (DP) de aproximadamente 10, como se determina por la relación (p/p) entre el fósforo orgánico total y el fosfato monoéster.

La relación DP (fósforo orgánico total) a (monoéster de fósforo) es inversamente proporcional a la energía de rotación óptica (α), como se muestra en la Figura 12. Esta relación puede usarse para controlar el grado de hidrólisis más convenientemente que con las mediciones directas de fósforo.

b) Ajuste del tamaño

45 Esta etapa retira oligosacáridos de longitud corta generados durante el procedimiento de hidrólisis. El hidrolizado obtenido anteriormente se ultrafiltró a través de una membrana de punto de corte de 30 kDa (12 volúmenes de diafiltración de tampón acetato 5 mM, pH 6,5). El retenido, que contenía las especies de alto Pm, se desechó; se cargó el permeado en una columna Q-Sepharose Fast Flow equilibrada en tampón acetato 5 mM, pH 6,5. La columna después se lavó con 5 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrado, después con 10 CV de

tampón acetato 5 mM/NaCl 125 mM pH6,5 para retirar los oligosacáridos con $DP \leq 6$. El oligosacárido de tamaño ajustado después se eluyó con 5 CV de tampón acetato 5 mM/NaCl 5 M pH 6,5.

La población de oligosacárido eluido tiene un DP promedio de aproximadamente 15.

c) Introducción de un grupo amino primario en el extremo reductor

- 5 Se añadió sal de amonio (acetato o cloruro) a la solución de oligosacárido de tamaño ajustado para una concentración final que varía de 49-300 g/l, después se añadió cianoborohidruro sódico a una concentración final que variaba de 12-73 g/l. Después de ajustar el pH entre 6-7,3, la mezcla se incubó a 37 °C durante 5 días.

Los amino-oligosacáridos después se purificaron por ultrafiltración en flujo tangencial con una membrana de punto de corte de 1 kDa o 3 kDa usando 13 volúmenes de diafiltración de NaCl 0,5 M seguido por 7 volúmenes de diafiltración de NaCl 20 mM. La solución de amino-oligosacárido purificado se analizó para el contenido de fósforo (una actividad química del antígeno) por el procedimiento de la ref. 146 y la cantidad de grupos amino introducidos por el procedimiento de la ref. 147.

Los oligosacáridos purificados después se secaron con rotavapor para retirar el agua.

d) Derivatización en éster activo

- 15 Los amino-oligosacáridos se solubilizaron en agua destilada a una concentración de grupo amino 40 mM, después se añadieron 9 volúmenes de DMSO seguido por trietilamina a una concentración final de 200 mM. A la solución resultante, se añadió N-hidroxisuccinimido diéster de ácido adípico para una concentración final de 480 mM.

La reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, después se precipitó el oligosacárido activado con acetona (80 % v/v de concentración final). El precipitado se recogió por centrifugación y se lavó varias veces con acetona para retirar el N-hidroxisuccinimido diéster de ácido adípico sin reaccionar y los subproductos. Finalmente, el oligosacárido activado se secó al vacío.

Se determinó la cantidad de grupos éster activo introducidos en la estructura de oligosacárido por un procedimiento colorimétrico como se describe en la ref. 148.

e) Conjugación a CRM₁₉₇

- 25 Se añadió el oligosacárido activado seco a una solución de 45 mg/ml de CRM₁₉₇ en tampón fosfato 0,01 M pH 7,2 para una relación éster activo/proteína (mol/mol) de 12:1. La reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante una noche. Después de este período el conjugado se purificó por cromatografía hidrófoba o ultrafiltración en flujo tangencial. El conjugado purificado MenA-CRM₁₉₇ se filtró a esterilidad y se almacenó a -20 °C o -60 °C hasta la formulación de la vacuna.

30 El conjugado se analizó para: el contenido de proteínas (ensayo de proteínas micro-BCA), el contenido de sacárido MenA (análisis colorimétrico de fósforo), contenido de sacárido libre, perfil de HPLC (en TSKgel G4000SW 7,5 mm DI x 30 cm), y SDS-PAGE. Las características de las preparaciones típicas se muestran en la siguiente tabla:

Código de Lote	Sacárido (mg/ml)	Proteína (mg/ml)	Glucosilación	KD
210201/A	0,257	0,864	0,3	0,489
210201/BS	0,308	1,354	0,23	0,503
210201BL	0,28	1,482	0,19	0,501
351230595	0,138	0,3	0,46	
010900	0,092	0,337	0,27	
DP29	0,105	0,245	0,43	
A1 (no ajustado en tamaño)	0,08	0,291	0,27	
A2 (ajustado en tamaño)	0,446	2,421	0,18	

C. Conjugación de polisacáridos del serogrupo W135

- 35 a) Hidrólisis

El polisacárido de meningococos de grupo W se hidrolizó en tampón acetato sódico 50 mM acético, pH 4,7 durante aproximadamente 3 horas a 80 °C. Esto produjo oligosacáridos con un DP promedio de aproximadamente 15 a 20 determinado por la relación entre ácido siálico (SA) y SA terminal reducido.

40 La relación DP de (SA total) a (SA terminal reducido) se refiere a la KD determinada por HPLC-SEC, como se muestra en la Figura 13. Esta relación puede usarse para controlar el grado de hidrólisis más convenientemente que

las mediciones directas de SA.

b) Ajuste de tamaño

5 El hidrolizado se ultrafiltró a través de una membrana de punto de corte de 30 kD (12 a 20 volúmenes de diafiltración de tampón acetato 5 mM/NaCl 15-30 mM pH 6,5). El retenido, que contenía las especies de alto PM, se desechó mientras el permeado se cargaba en una columna Q-Sepharose Fast Flow equilibrada en tampón acetato 5 mM/NaCl 15 mM pH 6,5. La columna después se lavó con 10 CV de tampón de equilibrado como para retirar los oligosacáridos con DP ≤ 3-4 y se eluyó con 3 CV de tampón acetato 5 mM/NaCl 500 mM pH 6,5.

c) Introducción de un grupo amino primario en el extremo reductor

10 Se añadió cloruro de amonio o acetato de amonio a la solución de oligosacárido de tamaño ajustado hasta una concentración final de 300 g/l, después se añadió cianoborohidruro sódico a concentración final de 49 g/l o 73 g/l. La mezcla se incubó a 50 °C durante 3 días.

15 Los amino-oligosacáridos después se purificaron por ultrafiltración en flujo tangencial como se ha descrito para el serogrupo A. El material purificado se analizó para su contenido de ácido siálico (procedimiento colorimétrico de acuerdo con la ref. 149) y/o galactosa (HPLC) (actividades químicas del antígeno MenW135). Los oligosacáridos purificados después se secaron con rotavapor para retirar el agua.

d) Derivatización en éster activo

Los amino-oligosacáridos secados se derivatizaron como se ha descrito anteriormente para el serogrupo A.

e) Conjugación a CRM₁₉₇

20 La conjugación se realizó como se ha descrito anteriormente para el serogrupo A pero, para purificar el conjugado, se usó diafiltración con una membrana de 30 kD (50 volúmenes de diafiltración de tampón fosfato 10 mM, pH 7,2). El conjugado purificado se filtró a esterilidad y se almacenó a -20 °C o -60 °C hasta la formulación de la vacuna.

El conjugado se analizó para los mismos parámetros que se han descrito anteriormente para el serogrupo A. Se ensayó el contenido de sacárido MenW por determinación colorimétrica de ácido siálico:

Código de Lote	Sácarido (mg/ml)	Proteína (mg/ml)	Glucosilación	KD
lote 1	5,73	3,52	1,63	0,296
lote 2/4,5	3,51	2,88	1,22	0,308
lote 3S	2,49	2,25	1,11	0,380
lote 3Sd	2,03	2,24	0,91	0,394
lote 3L	2,32	2,3	1,01	0,391
lote 3Ld	1,94	2,29	0,85	0,383
Lote 3S/pr. Glic6	0,363	0,82	0,44	0,498
Lote 3S/pr. Glic9	0,424	0,739	0,57	0,447
Lote 3S/pr. Glic12	0,479	0,714	0,671	0,414

25 **D. Conjugación de polisacáridos del serogrupo Y**

a) Hidrólisis

Se hidrolizó el polisacárido de meningococos del grupo Y como se ha descrito anteriormente para el serogrupo W135. Esto dio oligosacáridos con un DP promedio de aproximadamente 15 a 20 determinado por la relación entre SA y SA terminal reducido (medido convenientemente de forma indirecta como se describe en C (a) anterior).

30 b) Ajuste de tamaño, c) Introducción de grupo amino, d) Derivatización en éster activo y e) Conjugación

Estas etapas se realizaron como se ha descrito anteriormente para el serogrupo W135. El conjugado purificado se filtró a esterilidad y se almacenó a -20 °C o -60 °C hasta la formulación de la vacuna.

El conjugado se analizó del mismo modo que el descrito anteriormente para el serogrupo W135:

Código de Lote	Sácarido (mg/ml)	Proteína (mg/ml)	Glucosilación	KD
lote 1A	1,16	0,92	1,26	0,303
lote 1B	4,57	3,55	1,29	0,339
Lote 2/4,5	2,32	6,1	0,38	0,467
lote 2/6	1,75	5,73	0,3	0,498

E. Inmunogenicidad de conjugados individuales

5 Se descongelaron los conjugados a granel congelados. Cada uno se diluyó, en agitación, hasta una concentración final de 20 µg de sacárido/ml, fosfato 5 mM, 9 mg/ml de NaCl, fosfato de aluminio (para dar una concentración de Al³⁺ de 0,6 mg/ml), pH 7,2. Las mezclas después se mantuvieron, sin agitación, a 2-8 °C durante una noche y se diluyeron adicionalmente con solución salina hasta 4 µg de sacárido/ml para inmunización de ratones.

Se preparó un segundo conjunto de vacunas para cada serogrupo del mismo modo, pero la adición de fosfato de aluminio se reemplazó con el mismo volumen de agua.

10 Se inyectó s.c. a diez ratones Balb/c para cada grupo de inmunización dos veces con 0,5 ml de vacuna en las semanas 0 y 4. Se realizaron extracciones de sangre antes de la inmunización, el día antes de la segunda dosis y dos semanas después de la segunda dosis. Las inmunizaciones se realizaron con (a) la vacuna de conjugado con o sin alumbre, (b) control de solución salina y (c) control de polisacárido no conjugado.

15 Se determinaron los anticuerpos IgG antipolisacárido específicos en los sueros de animales inmunizados esencialmente como se describe en la ref. 150. Cada suero de ratón individual se analizó por duplicado mediante una curva de titulación y se calculó la GMT para cada grupo de inmunización. Los títulos se calcularon en unidades ELISA de ratón (MEU) usando el software "Titerun" (FDA). Se determinó la especificidad del título antipolisacárido por ELISA competitivo con el polisacárido relevante como competidor.

20 Como se muestra en la Figura 2, el conjugado MenA indujo altos títulos de anticuerpo en animales. Como se esperaba, el polisacárido no conjugado no fue inmunogénico. La formulación de conjugado con un fosfato de aluminio como adyuvante indujo un nivel mayor de anticuerpos en comparación con el título obtenido por el conjugado en solitario. Se observaron resultados similares para MenY (Figura 3) y MenW135 (Figura 4).

25 Se midió la subclase IgG de las respuestas inmunitarias post-II para diversos grupos. Se determinaron las subclases específicas usando el mismo procedimiento ELISA que el usado para la determinación del título total de IgG en la sección E anterior, pero usando fosfatasa alcalina-anti-IgG1, -IgG2a, -IgG2b o IgG3 de ratón (Zymed), como anticuerpo secundario. Los títulos se expresaron como DO_{405nm} obtenida después de 30 minutos de revelado de sustrato usando suero diluido 1:3200, y se muestran en las Figuras 14 (MenA), 15 (MenW135) y 16 (MenY). Las respuestas son principalmente de la subclase IgG1, que es la subclase predominantemente inducida en ratones por antígenos T-dependientes. Como los polisacáridos son de forma inherente antígenos T-independientes que no son capaces de inducir memoria inmunológica, estos datos muestran que la conjugación ha tenido el efecto deseado.

35 También se ensayaron sueros post-II para la actividad bactericida usando un ensayo *in vitro* para medir la lisis mediada por el complemento de bacterias. Se inactivaron sueros post-II durante 30 minutos a 56 °C antes de su uso en el ensayo, y se usó complemento de cría de conejo al 25 % como fuente de complemento. Se expresó el título bactericida como la dilución de suero recíproca que produce el 50 % de eliminación de bacterias frente a las siguientes cepas: MenA G8238, A1, F6124; MenW135 5554(OAc+) y 242317(OAc-); MenY 242975(OAc-) y 240539(OAc+).

Los resultados para MenA incluían:

Vehículo	Poly/oligo sacárido	Aprox. α DP	Adyuvante de aluminio	GMT	Actividad bactericida
CRM ₁₉₇	O	15	-	461	F8238: 2048-4096; F6124: 2048-4096
CRM ₁₉₇	O	15	fosfato	920	F8238: 4096; F6124: 4096
-	P	-	fosfato	3	F8238: 8; F6124: 128
CRM ₁₉₇	O	15	-	290	F8238: 512-1024
-	P	-	-	2	F8238: <4
CRM ₁₉₇	O	15	-	155	F8238: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	15	-	393	F8238: 1024
CRM ₁₉₇	O	15	-	396	-

ES 2 573 259 T3

(continuación)

Vehículo	Poly/oligo sacárido	Aprox. α DP	Adyuvante de aluminio	GMT	Actividad bactericida
CRM ₁₉₇	O	15	fosfato	1396	F8238: 4096
CRM ₁₉₇	O	15	fosfato	1461	F8238: 2048-4096
CRM ₁₉₇	O	15	fosfato	1654	F8238: 2048
CRM ₁₉₇	O	29	fosfato	1053	F8238: 2048
CRM ₁₉₇	O no ajustado en tamaño	10	fosfato	1449	F8238: 2048
CRM ₁₉₇	O	15	fosfato	626	F8238: 2048-4096
CRM ₁₉₇	O	15	-	742	-
CRM ₁₉₇	O	15	-	2207	-
CRM ₁₉₇	O	29	-	1363	-
CRM ₁₉₇	O no ajustado en tamaño	10	-	615	-
CRM ₁₉₇	O	15	fosfato	1515	-
CRM ₁₉₇	O	15	fosfato	876	-
CRM ₁₉₇	O	15	fosfato	1232	-
CRM ₁₉₇	O	15	fosfato	852	-
CRM ₁₉₇	O	15	fosfato	863	F8238: 2048; A1: 2048; F6124: >2048
CRM ₁₉₇	O	27	fosfato	1733	F8238: 4096-8192; F6124: 4096-8192
CRM ₁₉₇	O	15	fosfato	172	F8238: 1024; A1: 1024-2048; F6124: 2048
CRM ₁₉₇	O	15	hidróxido	619	F8238: 1024; A1: 2048; F6124: 2048

Los resultados para MenW135 incluían:

Vehículo	Poly/oligo sacárido	OAc	Adyuvante de aluminio	GMT	Actividad bactericida
CRM ₁₉₇	O	+	-	14	5554: 256-512
CRM ₁₉₇	O	+	fosfato	23	5554: 256-512
-	P		-	-	5554: 4
CRM ₁₉₇	O	+	-	45	5554: 1024
CRM ₁₉₇	O	+	-	101	5554: 64-128
CRM ₁₉₇	O	+	-	80	5554: 256-512
CRM ₁₉₇	O	+	fosfato	221	5554: 1024-2048; 242317: 1024-2048
CRM ₁₉₇	O	-	-	52	5554: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	-	fosfato	329	5554: 1024-2048; 242317:1024-2048
CRM ₁₉₇	O	+	-	41	5554: 256-512
CRM ₁₉₇	O	+	fosfato	24	5554: 1024; 242317: 128-256
CRM ₁₉₇	O	-	-	116	5554: 256-512
CRM ₁₉₇	O	-	fosfato	185	5554: 1024; 242317: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	+	fosfato	565	5554: 2048
CRM ₁₉₇	O	+	fosfato	328	5554: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	+	fosfato	490	5554: 1024-2048
CRM ₁₉₇	O	+	hidróxido	189	5554: 512-1024; 242317: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	+	fosfato	80	5554: 512-1024; 242317: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	+	hidróxido	277	5554: 512-1024; 242317: 1024-2048

Los resultados para MenY incluían:

Vehículo	Poly/oligo sacárido	α DP	Adyuvante de aluminio	GMT	Actividad bactericida
CRM ₁₉₇	O	>15	-	751	242975: 8192
CRM ₁₉₇	O	>15	fosfato	1190	242975: 8192-16384; 240539: 8192-16384
CRM ₁₉₇	O	>15	-	284	242975: 2048-4096
CRM ₁₉₇	O	>15	fosfato	775	242975: 2048-4096
-	P	-	-	-	242975: 256
CRM ₁₉₇	O	>15	-	1618	242975: 4096-8192
CRM ₁₉₇	O	>15	-	2123	242975: 2048
CRM ₁₉₇	O	<10	-	253	242975: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	<10	-	1060	242975: 256-512
CRM ₁₉₇	O	>15	hidróxido	1167	242975: 8192; 240539: 8192-16384
CRM ₁₉₇	O	>15	fosfato	665	242975: 8192; 240539: 8192-16384
CRM ₁₉₇	O	>15	fosfato	328	242975: 4096; 240539: 2048-4096
CRM ₁₉₇	O	>15	hidróxido	452	242975: 2048; 240539: 1024-2048

F. Inmunogenicidad de conjugado MenA en combinación con conjugado MenC

5 Se mezcló CRM-MenC concentrado a granel (de Chiron Vaccines, Italia) con CRM-MenA concentrado a granel (obtenido como se ha descrito anteriormente), se diluyeron y mezclaron por agitación. Se prepararon tres preparaciones diferentes. Cada una contenía 20 μ g de sacárido/ml para MenA, pero se incluyeron cantidades diferentes de 5 conjugados MenC: (i) 20 μ g de sacárido/ml (ii) 10 μ g de sacárido/ml; (iii) 5 μ g de sacárido/ml. Las relaciones de MenA:MenC (p/p) fueron por tanto: (i) 1:1; (ii) 2:1; (iii) 4:1.

10 Cada preparación también contenía fosfato sódico 5 mM, 9 mg/ml de NaCl, fosfato de aluminio (para dar una concentración de Al³⁺ de 0,6 mg/ml), pH 7,2. Cada mezcla después se mantuvo, sin agitación, a 2-8 °C durante una noche y se diluyó adicionalmente 1:5 con solución salina antes de la inmunización de los ratones.

Se preparó un segundo conjunto de vacunas del mismo modo, pero se reemplazó la adición de fosfato de aluminio con un volumen igual de agua.

15 Para cada una de las seis vacunas, se inmunizaron diez ratones Balb/c como se ha descrito anteriormente. Los grupos de control recibieron solución salina o conjugado MenA en solitario.

Se determinaron los anticuerpos antipolisacárido para MenA y MenC como se ha descrito anteriormente.

Los resultados obtenidos con la mezcla de conjugados MenA+MenC indican claramente que la relación (p/p) entre los componente A y C desempeñan un papel crucial para la inmunogenicidad de MenA.

20 El título anti-MenApS específico obtenido con el control de conjugado MenA fue mayor (con o sin adyuvante de alumbre) que para la combinación MenA+MenC a la misma dosificación (Figura 5a). Cuando se usa una cantidad inferior de conjugado MenC en la combinación, se induce un mejor título anti-MenApS por el componente de conjugado MenA. Al mismo tiempo, el título anti-MenC permanece aceptable (Figura 5b).

25 También se realizaron experimentos usando un modelo de cobaya. Se prepararon tres preparaciones diferentes, usando el mismo adyuvante de fosfato de aluminio que anteriormente (hidroxifosfato amorfo, relación molar PO₄/Al entre 0,84 y 0,92, 0,6 mg de Al^{3+/ml}):

Preparación	Men A*	Men C*	Relación MenA : MenC
A	20 μ g/ml	20 μ g/ml	1 : 1
B	40 μ g/ml	20 μ g/ml	2 : 1
C	20 μ g/ml	10 μ g/ml	1 : ½
* Expresado como sacárido			

Estas preparaciones se diluyeron 1:2 con solución salina y se usaron para inmunizar cobayas. Se inyectó s.c. a cinco cobayas (cepa Hartelley hembra, 450-500 gramos) para cada grupo de inmunización dos veces con 0,5 ml de vacuna en los días 0 y 28. Se realizaron extracciones de sangre antes de la primera inmunización y después en el

día 42. Los sueros se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes del análisis por ELISA y el ensayo bactericida en suero (contra MenA cepa MK 83/94 o MenC cepa C11). Los resultados se muestran en la Figura 19.

G. Vacuna de combinación para los serogrupos C, W135 e Y

5 Se mezclaron conjugados de polisacáridos de los serogrupos C, W135 e Y como se ha descrito anteriormente para dar una concentración final de $20\text{ }\mu\text{g}$ de sacárido/ml para cada conjugado. La vacuna contenía una concentración final de fosfato sódico 5 mM y 9 mg/ml de NaCl, pH 7,2. Después de almacenamiento durante una noche, la mezcla se diluyó para que contuviera $4\text{ }\mu\text{g}$ de sacárido/ml para cada conjugado para inmunización.

Las inmunizaciones y el análisis tuvieron lugar como anteriormente.

10 Los resultados muestran que la inmunogenicidad del conjugado MenW135 se potencia cuando se administra en combinación con los conjugados MenC y MenY, en comparación con la obtenida con el conjugado MenW135 en solitario (Figura 6). La inmunogenicidad de MenY fue comparable en la combinación a la obtenida con el conjugado individual (Figura 7) y también fue comparable con la inmunogenicidad del conjugado MenC (Figura 8).

H. Vacuna de combinación para los serogrupos A, C, W135 e Y

15 Se mezclaron conjugados de polisacáridos de los serogrupos A, C, W135 e Y como se ha descrito anteriormente para dar una concentración final de $20\text{ }\mu\text{g}$ de sacárido/ml para los conjugados del serogrupo A, W135 e Y y $5\text{ }\mu\text{g}$ de sacárido/ml para el conjugado del serogrupo C. La vacuna contenía una concentración final de fosfato sódico 5 mM , 9 mg/ml de NaCl, fosfato de aluminio (para dar una concentración de Al^{3+} de $0,6\text{ mg/ml}$), pH 7,2. La mezcla después se mantuvo sin agitación, a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una noche y se diluyó adicionalmente con solución salina para dar $4\text{ }\mu\text{g}$ de sacárido/ml para los conjugados A, W135 e Y y $1\text{ }\mu\text{g}$ de sacárido/ml para el conjugado C. Esta mezcla diluida se usó para inmunización.

20 Las inmunizaciones y el análisis tuvieron lugar como anteriormente, incluyendo los controles los conjugados individuales excepto para el serogrupo C.

25 La Figura 9 muestra que, como anteriormente, la inmunogenicidad del conjugado MenW135 se potenciaba cuando se administraba en combinación con los conjugados MenA, MenC y MenY. La Figura 10 muestra que la inmunogenicidad del conjugado MenY no es significativamente diferente cuando se suministra en combinación con los conjugados MenA, MenC y MenW135. La Figura 11 muestra que la inmunogenicidad del conjugado MenA disminuye de forma marcada en la combinación, incluso con el conjugado MenC administrado a una dosificación inferior ($1/4$). Esta competición antigénica no se observa en la vacuna de polisacárido tetravalente (ACWY) no conjugada [5].

30 I. Antígeno de serogrupo A liofilizado

El polisacárido capsular de *N. meningitidis* de serogrupo A es particularmente susceptible a hidrólisis. Por lo tanto, se prepararon conjugados del oligosacárido capsular MenA en forma liofilizada, lista para reconstitución en el momento de la administración. La forma liofilizada se preparó para que tuviera componentes que dan la siguiente composición después de la reconstitución en una dosis unitaria:

35

Componente	Concentración
CRM-MenA	$20\text{ }\mu\text{g}$ de sacárido/ml
Tampón fosfato potásico	5 mM
Manitol	15 mg/ml

Esta composición no tiene adyuvante. Se prepararon dos adyuvantes para su reconstitución:

Componente	Concentración	Concentración
Hidróxido de aluminio	$0,68\text{ mg Al}^{3+}/\text{ml}$	-
Fosfato de aluminio *	-	$0,6\text{ mg Al}^{3+}/\text{ml}$
Tampón fosfato sódico	-	10 mM
Tampón histidina	10 mM	-
Cloruro sódico	9 mg/ml	9 mg/ml
Tween 80	$0,005\text{ }\%$	$0,005\text{ }\%$
PH	$7,2 \pm 0,05$	$7,2 \pm 0,05$
* hidroxifosfato amorfo, relación molar de PO_4/Al entre $0,84$ y $0,92$		

Cuando se reconstituye con agua para inyección, la estabilidad del componente sacárido fue la siguiente:

Tiempo (días)	Almacenado a 2-8 °C			Almacenado a 36-38 °C		
	Sacárido total (µg/ml)	Sacárido libre (µg /ml)	Sacárido libre %	Sacárido total (µg /ml)	Sacárido libre (µg /ml)	Sacárido libre %
0	17, 72	1, 04	5, 9	17, 72	1, 04	5, 9
15	17, 01	0, 88	5, 2	16, 52	2, 26	13, 7
30	17, 82	0, 89	5, 0	17, 29	2, 64	15, 3

5 Sobre la misma escala de tiempo de 4 semanas, el pH fue estable a 7,2 tanto a 2-8 °C como a 36-38 °C, el contenido de proteínas fue estable a aproximadamente 24,5 µg/ml, y el contenido de humedad estuvo por debajo de 2,5 %.

Cuando se reconstituye con la solución adyuvante de fosfato de aluminio y se almacena a 2-8 °C, la estabilidad fue la siguiente:

Tiempo (horas)	Sacárido total (µg /ml)	Sacárido libre (µg /ml)	Sacárido libre %
0	16, 62	1, 09	6, 6
24	16, 51	0, 98	5, 9
48	16, 83	0, 99	5, 9

J. Vacuna de combinación para los serogrupos A, C, W135 e Y (conjugado de serogrupo A liofilizado)

10 Se preparó una mezcla trivalente de los componentes MenC, W135 e Y adsorbidos en un adyuvante de hidróxido de aluminio (2 mg/ml) o mezclados con un adyuvante de fosfato de aluminio (hidroxifosfato amorfo, relación molar PO₄/Al entre 0,84 y 0,92, 0,6 mg/ml de Al³⁺, en presencia de tampón fosfato 10 mM). Las composiciones de las dos mezclas trivalentes fueron las siguientes:

Componente	Concentración	Concentración
Hidróxido de aluminio	0,68 mg Al ³⁺ /ml	-
Fosfato de aluminio*	-	0.6mg Al ³⁺ /ml
CRM-MenC	20mg sacárido/ml	20mg sacárido/ml
CRM-MenY	20mg sacárido/ml	20mg sacárido/ml
CRM-MenW135	20mg sacárido/ml	20mg sacárido/ml
Tampón de fosfato sódico	-	10 mM
Tampón histidina	10 mM	-
Cloruro sódico	9 mg/ml	9 mg/ml
Tween 80	0,005 %	0,005%

* hidroxifosfato amorfo, relación molar PO₄/Al entre 0,84 y 0,92

15 Para la mezcla de hidróxido, la estabilidad de los componentes sacáridos fue la siguiente:

Tiempo (días)	Almacenado a 2-8 °C		Almacenado a 36-38 °C	
	Sacárido libre (µg/ml)	Sacárido libre %	Sacárido libre (µg/ml)	Sacárido libre %
MenC a granel				
0	<1,2	<6	<1,2	<6
15	<1,2	<6	<1,2	<6
30	<1,2	<6	<1,2	<6
Viales de MenC				
0	<1,2	<6	<1,2	<6
15	<1,2	<6	<1,2	<6
30	<1,2	<6	1,3	6,6

(continuación)

Tiempo (días)	Almacenado a 2-8 °C		Almacenado a 36-38 °C	
	Sacárido libre (µg/ml)	Sacárido libre %	Sacárido libre (µg/ml)	Sacárido libre %
MenW135 a granel				
0	2,5	12,5	2,5	12,5
15	2,3	11,4	3,4	16,8
30	2,3	11,5	3,5	17,3
Viales de MenW135				
0	2,1	10,6	2,1	10,6
15	2,3	11,7	2,7	13,3
30	2,0	10,2	3,3	16,3
MenY a granel				
0	1,7	8,3	1,7	8,3
15	<1,3	<6,3	2,0	10,2
30	1,3	6,3	2,4	12,2
Viales de MenY				
0	1,4	7,1	1,4	7,1
15	1,5	7,6	2,1	10,7
30	1,3	6,3	2,9	14,3

Sobre la misma escala de tiempo de 4 semanas, el pH fue estable a $7,15 \pm 0,05$ tanto a 2-8 °C como a 36-38 °C.

Para la mezcla de fosfato, la estabilidad de los componentes sacáridos fue la siguiente:

Tiempo (días)	Almacenado a 2-8 °C			Almacenado a 36-38 °C		
	Sacárido total (µg/ml)	Sacárido libre (mg/ml)	Sacárido libre %	Sacárido total (µg/ml)	Sacárido libre (µg/ml)	Sacárido libre %
MenC a granel						
0	22,8	<1,0	<5	22,8	<1,0	<5
15	17,2	<1,0	<5	18,6	<1,0	<5
30	18,9	<1,0	<5	20,5	<1,0	<5
Viales de MenC						
0	20,5	<1,0	<5	20,5	<1,0	<5
15	18,3	<1,0	<5	23,4	<1,0	<5
30	18,0	<1,0	<5	20,5	<1,0	<5
MenW135 a granel						
0	20,7	2,0	10,4	20,7	2,0	10,4
15	21,9	2,3	11,6	21,2	2,1	10,3
30	19,6	2,1	10,6	21,0	2,4	11,8
Viales de MenW135						
0	23,4	1,7	8,4	23,4	1,7	8,4
15	21,2	1,9	9,5	20,1	2,2	11,1
30	20,1	2,2	11,2	21,3	3,2	16,1
MenY a granel						
0	19,1	<1,1	<5,3	19,1	<1,1	<5,3
15	20,1	1,4	6,8	18,7	1,3	6,4
30	18,6	1,4	7,6	19,2	1,7	8,3
Viales de MenY						
0	21,4	<1,1	<5,3	21,4	<1,1	<5,3
15	19,6	1,4	6,8	19,0	1,5	7,4
30	17,7	1,2	6,2	18,4	1,9	9,4

Sobre la misma escala de tiempo de 4 semanas, el pH fue estable a $7,5 \pm 0,05$ tanto a 2-8 °C como a 36-38 °C.

5 Las composiciones líquidas trivalentes se diluyeron y se usaron 0,5 ml para reconstituir el conjugado MenA liofilizado. La mezcla tetravalente resultante se administró a diez ratones Balb/c (hembras de 6-8 semanas de edad) por grupo por inyección subcutánea en el día 0 y 28. La mezcla contenía 2 µg de cada conjugado de sacárido por dosis, que representa 1/5 de la dosis humana individual (SHD). Los controles fueron solución salina o polisacáridos homólogos no conjugados. Se realizaron extracciones de sangre antes de la inmunización y después en el día 42, con sueros almacenados a -70 °C. Se determinó la IgG como se ha descrito anteriormente.

Todos los conjugados usados eran seguros e inmunogénicos en los animales. Los títulos ELISA post-II GMT (con intervalos de confianza del 95 %) fueron los siguientes:

Vacuna	Adyuvante	A	Y	W135	C
MenA (liofilizado y resuspendido)	Fosfato de aluminio	172 (69-439)	-	-	-
	Hidróxido de aluminio	619 (419-906)	-	-	-
MenY	Fosfato de aluminio	-	328 (147-731)	-	-
	Hidróxido de aluminio	-	452 (344-593)	-	-
MenW	Fosfato de aluminio	-	-	80 (28-225)	-
	Hidróxido de aluminio	-	-	277 (185-411)	-
MenC	Fosfato de aluminio	-	-	-	317 (152-659)
	Hidróxido de aluminio	-	-	-	723 (615-851)
MenA (liofilizado) + MenC,W135,Y	Fosfato de aluminio	32 (15-68)	397 (252-627)	99 (35-288)	114 (53-246)
	Hidróxido de aluminio	206 (112-372)	141 (97-205)	139 (76-251)	163 (122-218)

10

La Figura 17 muestra los resultados del análisis de subclase de IgG para: (17A) MenA; (17B) MenC; (17C) MenW135; y (17D) MenY. IgG1 es claramente la subclase más prominente.

Los títulos bactericidas en suero fueron los siguientes:

15

Vacuna	Adyuvante	Anti-MenA			Anti-MenY		Anti-MenW135		Anti-MenC
		F8238	A1	F6124	242975	240539	5554	242317	
MenA (lío filizado)	Fosfato de aluminio	512-1024	1024-2048	2048	-	-	-	-	-
	Hidróxido de aluminio	1024-2048	1024-2048	2048	-	-	-	-	-
MenY	Fosfato de aluminio	-	-	-	4096	2048-4096	-	-	-
	Hidróxido de aluminio	-	-	-	2048	1024-2048	-	-	-
MenW	Fosfato de aluminio	-	-	-	-	-	512	512-1024	-
	Hidróxido de aluminio	-	-	-	-	-	1024	1024-2048	-
MenC	Fosfato de aluminio	-	-	-	-	-	-	-	2048-4096
	Hidróxido de aluminio	-	-	-	-	-	-	-	4096
MenA (lío filizado) + MenC, W135, Y	Fosfato de aluminio	128-256	1024	1024-2048	2048	-	256-512	1024	512
	Hidróxido de aluminio	512	1024-2048	1024-2048	2048-4096	-	256-512	1024	512-1024

K. Vacuna de combinación para los serogrupos A, C, W135 e Y (diferentes dosificaciones)

Se inmunizaron ratones como se ha descrito anteriormente, pero las composiciones de vacuna contenían diferentes relaciones de los diversos conjugados de oligosacárido. Las dosis fueron de forma variada 0,5, 1, 2 o 4 µg/dosis. Se usó oligo-conjugado MenA liofilizado en todos los experimentos.

5 Los títulos ELISA fueron los siguientes:

Cantidad de antígeno (µg/dosis)				Adyuvante de aluminio	ELISA GMT (intervalo de confianza del 95 %)			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
4	2	2	2	Fosfato	177 (107-291)	367 (263-510)	239 (135-424)	239 (184-311)
4	2	2	2	Hidróxido	390 (313-486)	494 (345-706)	338 (266-430)	158 (96-260)
2	2	2	2	Fosfato	132 (59-296)	582 (268-1155)	143 (75-272)	247 (152-400)
2	2	2	2	Hidróxido	337 (239-476)	569 (462-679)	171 (117-251)	100 (59-169)
4	2	1	1	Fosfato	137 (47-397)	192 (88-421)	18 (4-75)	315 (174-571)
4	2	1	0.5	Fosfato	152 (85-271)	207 (100-428)	51 (21-125)	220 (125-388)
4	2	1	2	Fosfato	113 (49-263)	230 (98-540)	23 (6-91)	267 (81-877)
4	2	0,5	1	Fosfato	267 (109-656)	504 (300-847)	46 (15-134)	583 (330-1030)
4	2	2	1	Fosfato	87 (49-155)	118 (51-278)	24 (8-72)	214 (140-326)
2	2	1	1	Fosfato	217 (132-355)	514 (332-796)	110 (66-183)	206 (141-300)
2	2	1	0.5	Fosfato	105 (40-279)	381 (180-808)	90 (34-236)	206 (96-445)
2	2	1	2	Fosfato	155 (71-339)	374 (196-713)	53 (28-100)	502 (335-752)
2	2	0,5	1	Fosfato	224 (125-400)	358 (223-577)	43 (14-128)	624 (426-914)
2	2	2	1	Fosfato	180 (113-288)	306 (190-492)	70 (34-146)	423 (258-696)

Los títulos bactericidas en suero fueron los siguientes:

Cantidad de antígeno (µg/dosis)				Adyuvante de aluminio	Título de anticuerpo bactericida			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
4	2	2	2	Fosfato	256-512	1024-2048	1024-2048	4096-8192
4	2	2	2	Hidróxido	1024-2048	256-512	1024-2048	1024-2048
2	2	2	2	Fosfato	512-1024	1024-2048	128-256	8192-16384
2	2	2	2	Hidróxido	256	1024-2048	256	512-1024
4	2	1	1	Fosfato	512-1024	2048	128	2048-4096
4	2	1	0,5	Fosfato	512-1024	1024-2048	128	2048-4096
4	2	1	2	Fosfato	512-1024	2048-4096	128	8192-16384
4	2	0,5	1	Fosfato	1024-2048	8192	256-512	8192-16384
4	2	2	1	Fosfato	-	2048-4096	128	4096-8192
2	2	1	1	Fosfato	1024-2048	1024-2048	256	4096-8192
2	2	1	0,5	Fosfato	1024-2048	2048-4096	256-512	2048-4096
2	2	1	2	Fosfato	512-1024	1024-2048	128	8192-16384
2	2	0,5	1	Fosfato	1024-2048	2048	256-512	4096-8192
2	2	2	1	Fosfato	128-256	512-1024	64-128	1024-2048

10 Se realizó un segundo conjunto de experimentos usando una dosificación de 2 µg/ml de sacárido para MenA y MenC, la mitad de esa dosificación para MenY, y una cuarta parte de la dosificación para MenW135. Los títulos ELISA fueron los siguientes:

ES 2 573 259 T3

Cantidad de antígeno (µg/dosis)				Adyuvante de aluminio	ELISA GMT (intervalo de confianza del 95 %)			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
2	2	2	2	Fosfato	32 (15-68)	114 (53-246)	99 (35-288)	397 (252-627)
				Hidróxido	206 (112-372)	163 (122-218)	139 (76-251)	141 (97-205)
2	2	1	0,5	Fosfato	96 (49-187)	238 (101-561)	42 (20-89)	315 (114-867)
				Hidróxido	293 (144-597)	267 (158-451)	83 (43-163)	244 (152-392)

Los títulos bactericidas en suero fueron los siguientes:

Cantidad de antígeno (µg/dosis)		Adyuvante de aluminio		A			C		W135		Y
A	C	W	Y	F8238	A1	F6124	C11	5554	242317	Y	
2	2	2	2	128-256	1024	1024-2048	512	256-512	1024	2048	
				512	1024-2048	1024-2048	512-1024	256-512	1024	2048-4096	
2	2	1	0,5	256	-	1024-2048	512	256-512	1024	2048-4096	
				128	-	512-1024	512-1024	512-1024	1024	1024	

L. Conjugados de oligosacárido MenA, W135 e Y

La siguiente tabla muestra los datos referidos a conjugados MenA, MenW135 y MenY adecuados para preparar composiciones de combinación de la invención:

	A	W135	Y
DP después del ajuste de tamaño	16,6	21,9	21,1
Relación sacárido/proteína	0,5	1,1	0,7
KD	0,44	0,36	0,41
Sacárido libre	5%	10%	5%
Proteína libre	<2%	<2%	<2%

- 5 Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplos solamente y pueden hacerse modificaciones quedando dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

- [1] Frash (1990) pág. 123-145 of Advances in Biotechnological Processes vol. 13 (eds. Mizrahi y Van Wezel)
- [2] Armand y col. (1982) J. Biol. Stand. 10:335-339.
- 10 [3] Cadoz y col. (1985) Vaccine 3:340-342.
- [4] MMWR (1997) 46(RR-5) 1-10.
- [5] Baklaic y col. (1983) Infect. Immun. 42:599-604.
- [6] Costantino y col. (1992) Vaccine 10:691-698.
- [7] Documento WO02/002
- 15 [8] Inzana (1987) Infect. Immun. 55:1573-1579.
- [9] Documento WO98/32873.
- [10] Patente de Estados Unidos 4.753.796.
- [11] Patente europea 0072513.
- [12] Solicitud de patente de R.U. 0207117.3.
- 20 [13] Pon y col. (1997) J Exp Med 185:1929-1938.
- [14] Ravenscroft y col. (1999) Vaccine 17:2802-2816.
- [15] Ramsay y col. (2001) Lancet 357(9251):195-196.
- [16] Lindberg (1999) Vaccine 17 Supl 2:S28-36.
- [17] Buttery y Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-168.
- 25 [18] Ahmad y Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii.
- [19] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567.
- [20] Patente europea 0477508.
- [21] Patente de Estados Unidos 5.306.492.
- [22] Documento WO98/42721.
- 30 [23] Dick y col. in Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, Vol. 10, pág. 48-114.
- [24] Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [25] Anónimo (Enero 2002) Research Disclosure, 453077.
- [26] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.
- [27] Anderson y col. (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.
- 35 [28] Documento EP-A-0372501.
- [29] Documento EP-A-0378881.
- [30] Documento EP-A-0427347.
- [31] Documento WO93/17712.
- [32] Documento WO94/03208.
- 40 [33] Documento WO98/58668.
- [34] Documento EP-A-0471177.
- [35] Documento WO91/01146
- [36] Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
- [37] Documento WO00/56360.
- 45 [38] Documento WO00/61761.
- [39] Documento WO99/42130
- [40] Documento WO96/40242
- [41] Lees y col. (1996) Vaccine 14:190-198.
- [42] Documento WO95/08348.
- 50 [43] Patente de Estados Unidos 4.882.317
- [44] Patente de Estados Unidos 4.695.624
- [45] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
- [46] Documento EP-A-0208375
- [47] Documento WO00/10599

- [48] Gever y col., *Med. Microbiol. Immunol*, 165: 171-288 (1979).
- [49] Patente de Estados Unidos 4.057.685.
- [50] Patentes de Estados Unidos 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [51] Patente de Estados Unidos 4.459.286.
- 5 [52] Patente de Estados Unidos 4.965.338
- [53] Patente de Estados Unidos 4.663.160.
- [54] Patente de Estados Unidos 4.761.283
- [55] Patente de Estados Unidos 4.356.170
- [56] Lei y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
- 10 [57] Documento WO00/38711; Patente de Estados Unidos 6.146.902.
- [58] McLeod Griffiss y col. (1981) *Infect. Immun.* 34:725-732.
- [59] Documento WO99/24578.
- [60] Documento WO99/36544.
- [61] Documento WO99/57280.
- 15 [62] Documento WO00/22430.
- [63] Tettelin y col. (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [64] Pizza y col. (2000) *Science* 287:1816-1820.
- [65] Documento WO01/52885.
- [66] Bjune y col. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- 20 [67] Fukasawa y col. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- [68] Rosenqvist y col. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- [69] Documento WO96/14086.
- [70] Covacci y Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592.
- [71] Documento WO93/18150.
- 25 [72] Covacci y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5791-5795.
- [73] Tummuru y col. (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809.
- [74] Marchetti y col. (1998) *Vaccine* 16:33-37.
- [75] Telford y col. (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.
- [76] Evans y col. (1995) *Gene* 153:123-127.
- 30 [77] Documento WO96/01272 y Documento WO96/01273, especialmente la SEQ ID NO: 6.
- [78] Documento WO97/25429.
- [79] Documento WO98/04702.
- [80] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [81] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- 35 [82] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [83] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [84] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [85] Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Supl:S63-68 y 79-80.
- [86] Documento WO93/24148.
- 40 [87] Costantino y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [88] Documento WO97/00697.
- [89] Hsu y col. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- [90] Documento WO02/02606.
- [91] Kalman y col. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- 45 [92] Read y col. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- [93] Shirai y col. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Supl 3):S524-S527.
- [94] Documento WO99/27105
- [95] Documento WO00/27994.
- [96] Documento WO00/37494.
- 50 [97] Documento WO99/28475.
- [98] Ross y col. (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- [99] Sutter y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [100] Zimmerman y Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [101] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Supl:S2-6.
- 55 [102] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Ene 16;47(1):12, 19.
- [103] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin y Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [104] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl 1:S101-107.
- [105] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
- [106] Documento WO02/3477
- 60 [107] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- [108] Ferretti y col. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [109] Kuroda y col. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219.
- [110] Anderson (2000) *Vaccine* 19 Supl 1:559-65.
- [111] Kahn (2000) *Curr Opin Pediatr* 12:257-262.
- 65 [112] Crowe (1995) *Vaccine* 13:415-421.
- [113] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85-100.

- [114] Demicheli y col. (1998) *Vaccine* 16:880-884.
 [115] Stepanov y col. (1996) *J Biotechnol* 44:155-160.
 [116] Wassilak y Orenstein, Capítulo 4 de *Vaccines* (eds. Plotkin y Mortimer), 1988.
 [117] Gustafsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
 5 [118] Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
 [119] Documento WO97/28273.
 [120] Lieberman y col. (1996) *JAMA* 275:1499-1503.
 [121] Documento WO00/56365.
 [122] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª ed ISBN: 0683306472
 10 [123] *Vaccine Design*. (1995) eds. Powell y Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
 [124] Documento WO90/14837.
 [125] Patente de Estados Unidos 6.299.884.
 [126] Documento WO00/07621.
 [127] Documento WO99/44636.
 15 [128] Documento GB-2220221.
 [129] Documento EP-A-0689454.
 [130] Documento WO00/56358.
 [131] Documento EP-A-0835318.
 [132] Documento EP-A-0735898.
 20 [133] Documento EP-A-0761231.
 [134] Documento WO99/52549.
 [135] Documento WO01/21207.
 [136] Documento WO01/21152.
 [137] Documento WO00/62800.
 25 [138] Documento WO00/23105.
 [139] Documento WO99/11241.
 [140] Documento WO98/57659.
 [141] Del Giudice y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 19, número 1.
 [142] Documento WO99/27960.
 30 [143] Documento WO98/20734.
 [144] Solicitud de patente de R.U. 0118249.2.
 [145] Documento WO01/30390.
 [146] Chen y col. (1956) *Anal. Chem.* (1956) 28:1756-1758.
 [147] Habeeb y col. (1966) *Anal. Biochem.* 14:328-336.
 35 [148] Miron y Wilchek (1982) *Anal. Biochem.* 126:433-435.
 [149] Svennerholm (1957) *Biochem. Biophys. Acta* 24:604-611.
 [150] Carlone y col. (1992) *J.Clin. Microbiol.* 30:154-159.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar y conjugar un polisacárido capsular bacteriano de *Haemophilus influenzae* tipo B a una proteína vehículo de toxoide diftérico CRM₁₉₇, que comprende purificar el polisacárido, que comprende las etapas de (a) precipitación del polisacárido usando uno o más detergentes catiónicos incluyendo bromuro de cetiltrimetilamonio, seguido por (b) solubilización del polisacárido precipitado usando etanol a una concentración final entre el 75 % y el 95 %, después (c) tratamiento del polisacárido solubilizado obtenido en la etapa (b) para retirar los contaminantes, que comprende filtración por tamaño y/o ultrafiltración, activación o funcionalización del polisacárido, y conjugación del polisacárido a la proteína vehículo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polisacárido obtenido en la etapa (c) se precipita posteriormente.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la precipitación es mediante la adición de sales de calcio o sodio.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la activación implica un reactivo de cianilación.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la conjugación es mediante un enlazador.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que, después de la conjugación, se separan los sacáridos libres y conjugados.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la separación usa cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial o diafiltración.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el material de partida para la precipitación en la etapa (a) es sobrenadante de un cultivo bacteriano centrifugado o cultivo concentrado.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polisacárido precipitado de la etapa (a) se recoge por centrifugación antes de la solubilización en la etapa (b).
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el etanol se añade al polisacárido precipitado en la etapa (b) en forma pura o como una mezcla de etanol:agua.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polisacárido purificado se hidroliza para formar oligosacáridos.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que se ajusta el tamaño del hidrolizado para retirar oligosacáridos de longitud corta.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el conjugado tiene una relación de sacárido:proteína (p/p) entre 0,5:1 y 5:1.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el conjugado tiene una relación de sacárido:proteína (p/p) entre 1:1,25 y 1:2,5.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el conjugado se mezcla con otras moléculas biológicas.
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que el conjugado se mezcla con otras moléculas biológicas para formar una composición que comprende sacáridos de *N. meningitidis* serogrupos A+C, A+W 135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, C+W135+Y o A+C+W135+Y.

FIGURA 1

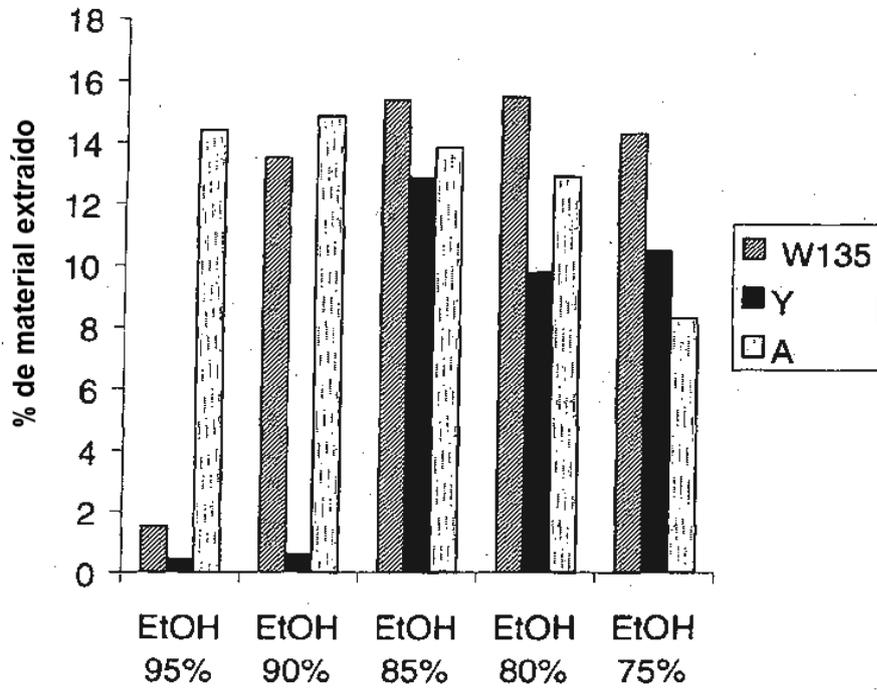


FIGURA 2

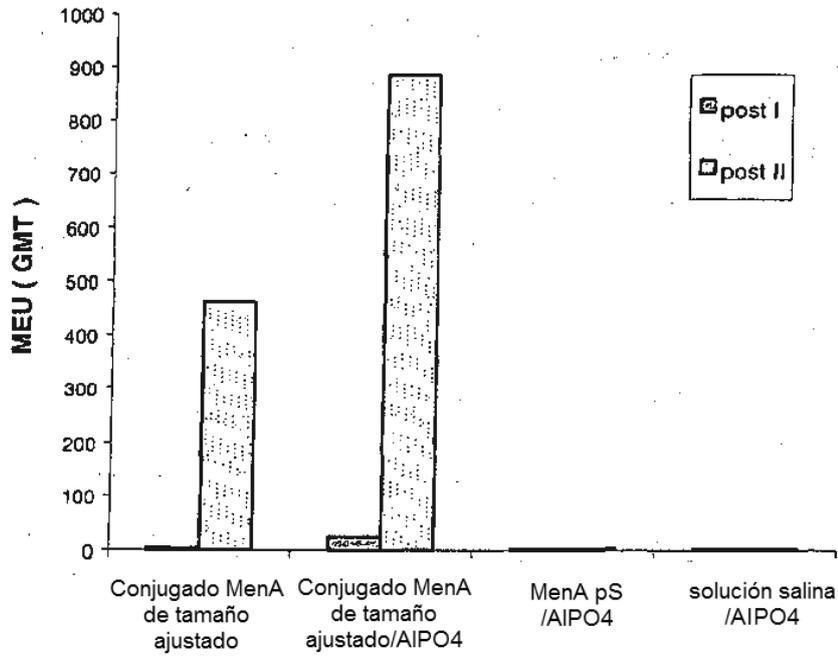


FIGURA 3

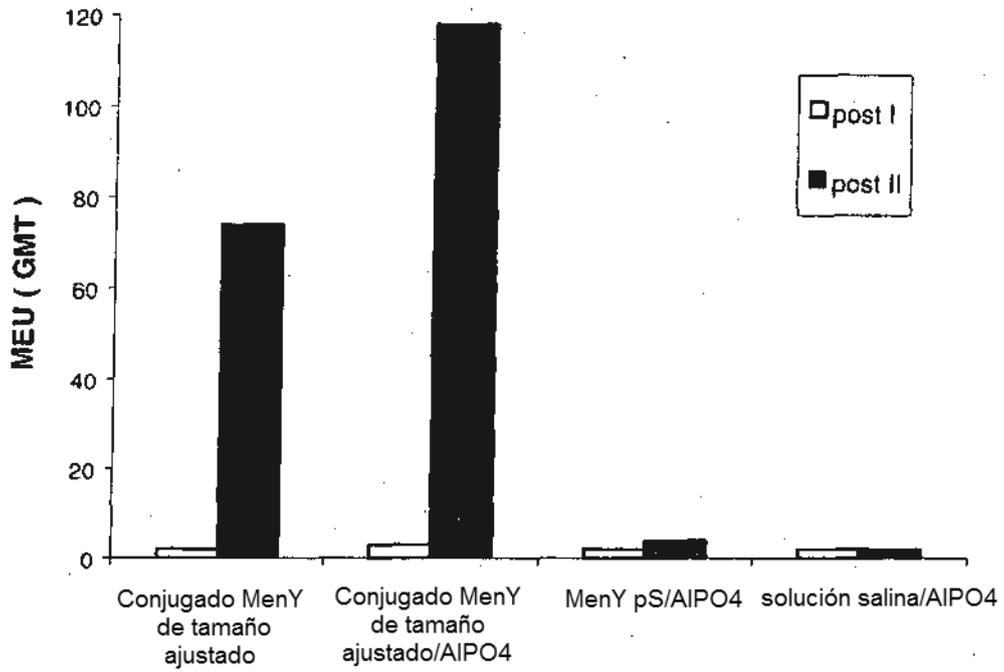


FIGURA 4

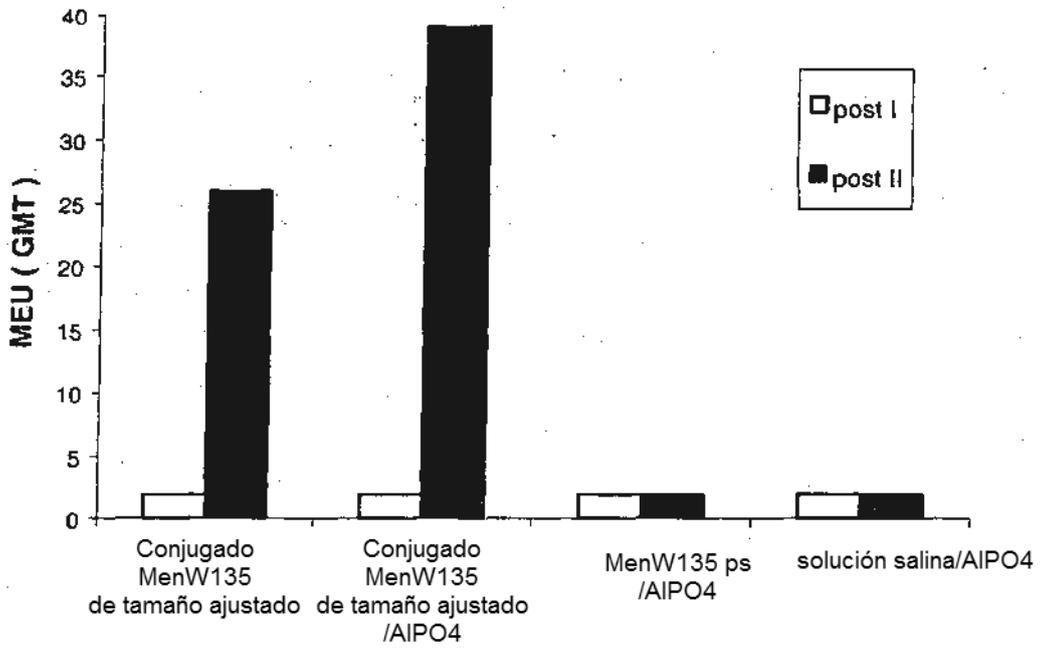


FIGURA 5a

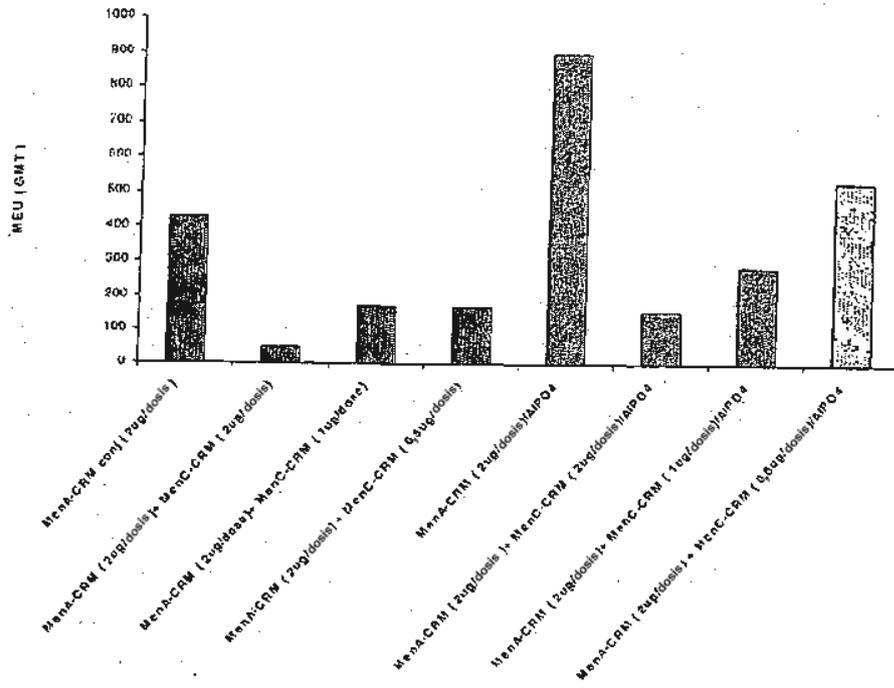


FIGURA 5b

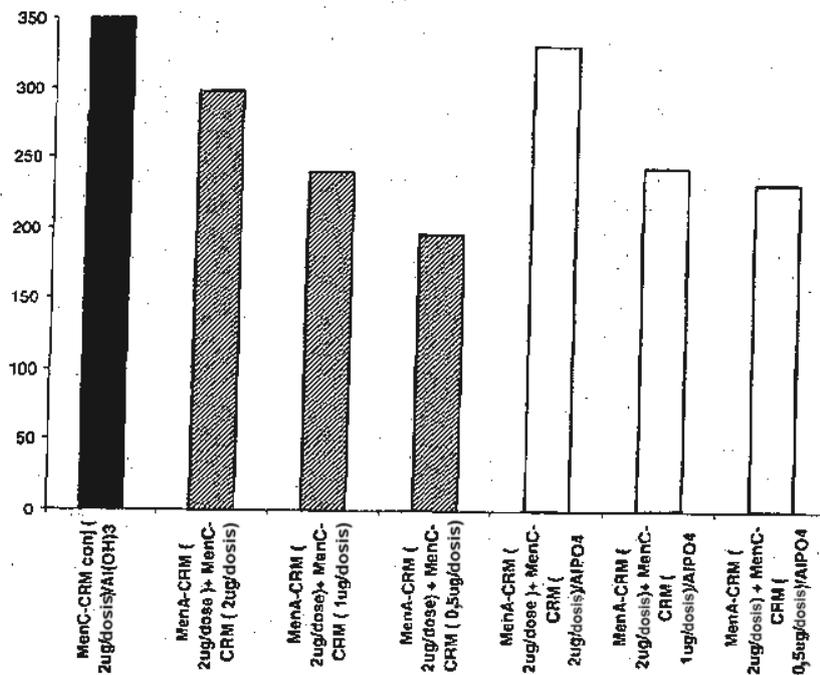


FIGURA 6

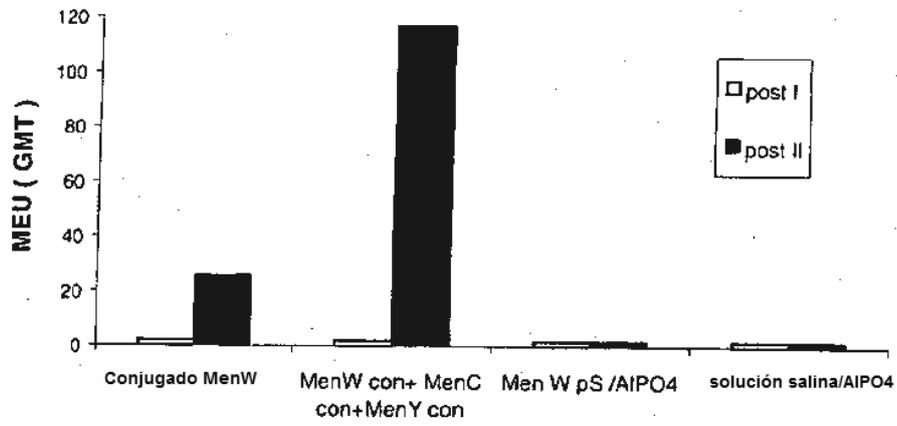


FIGURA 7

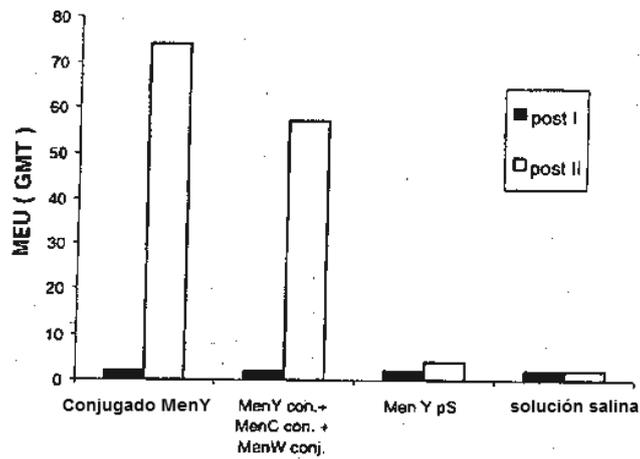


FIGURA 8

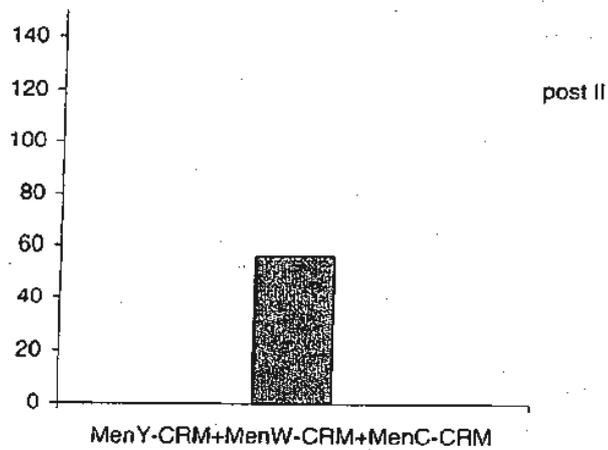


FIGURA 9

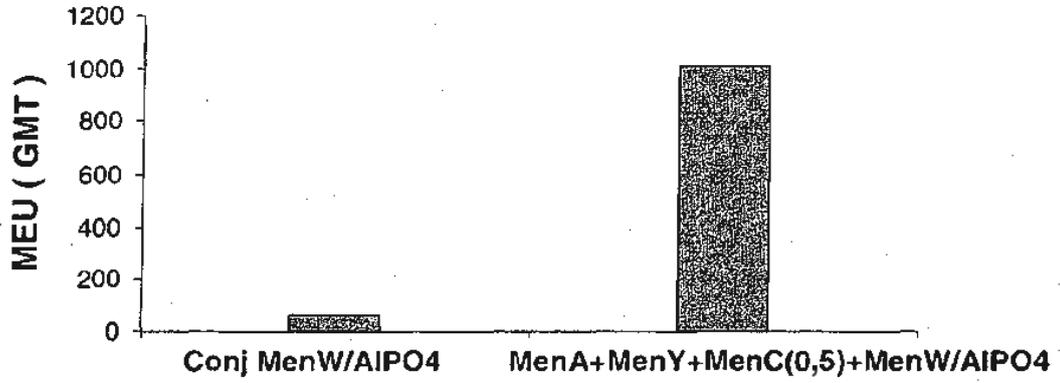


FIGURA 10

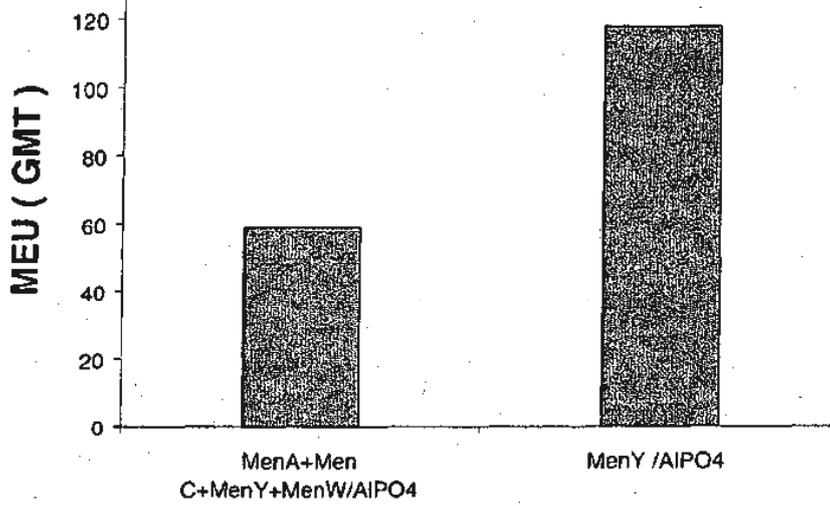


FIGURA 11

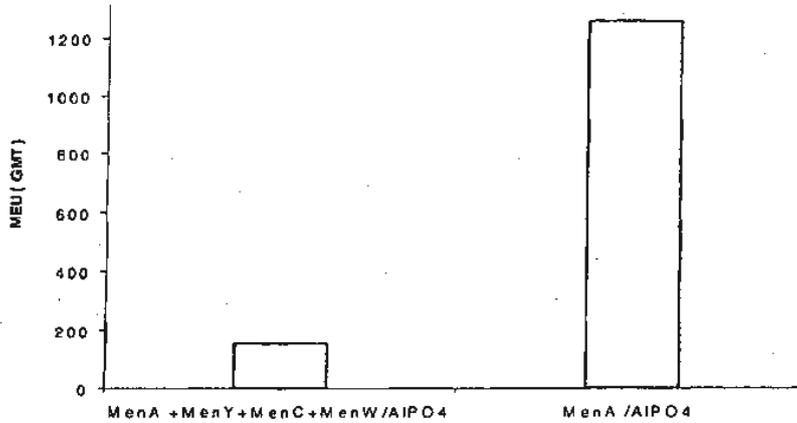


FIGURA 12

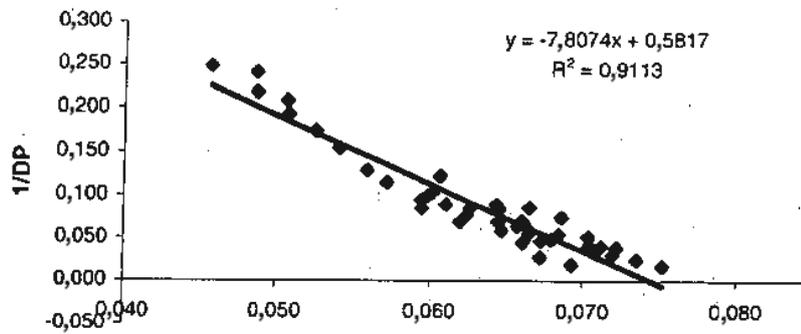


FIGURA 13

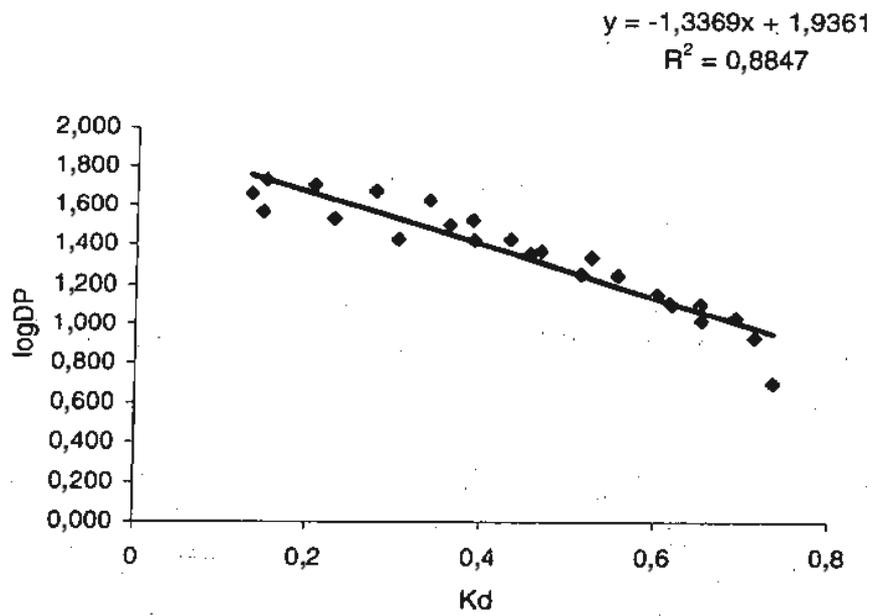


FIGURA 14

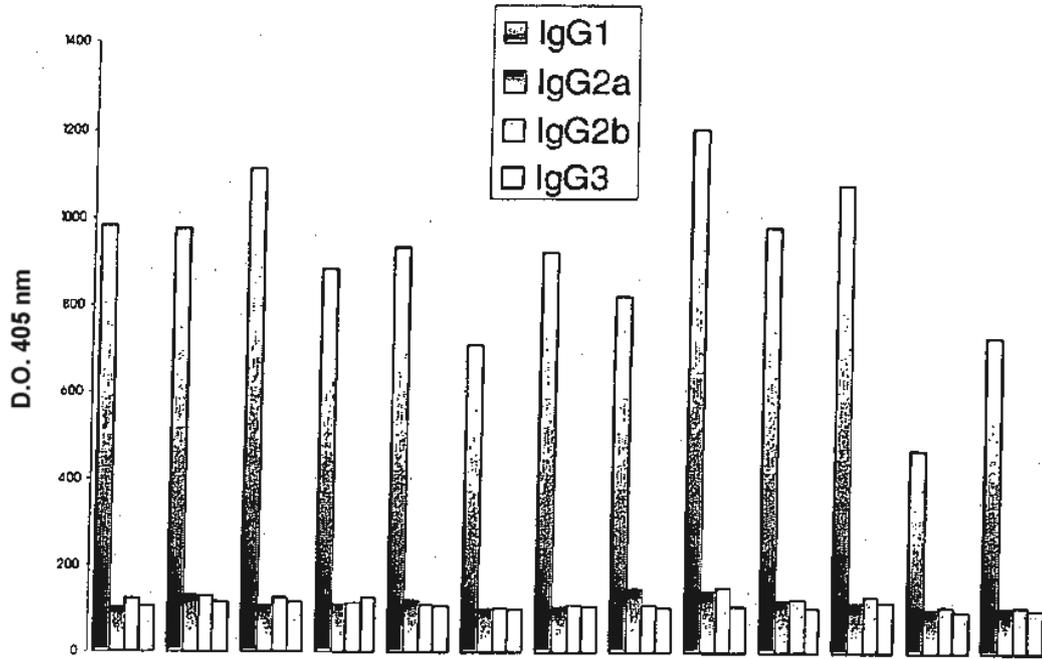


FIGURA 15

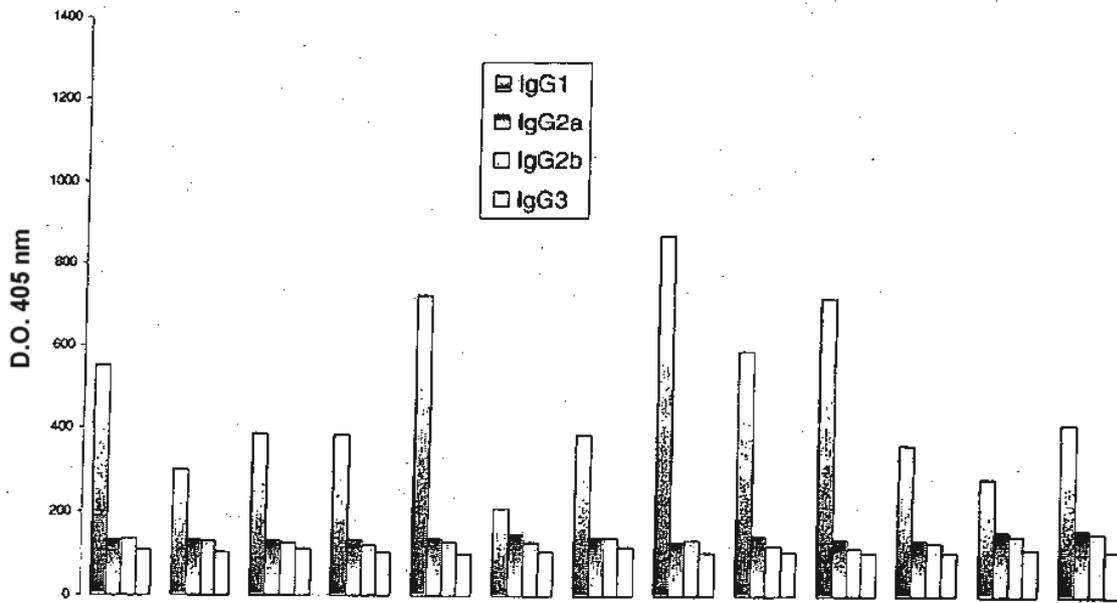


FIGURA 16

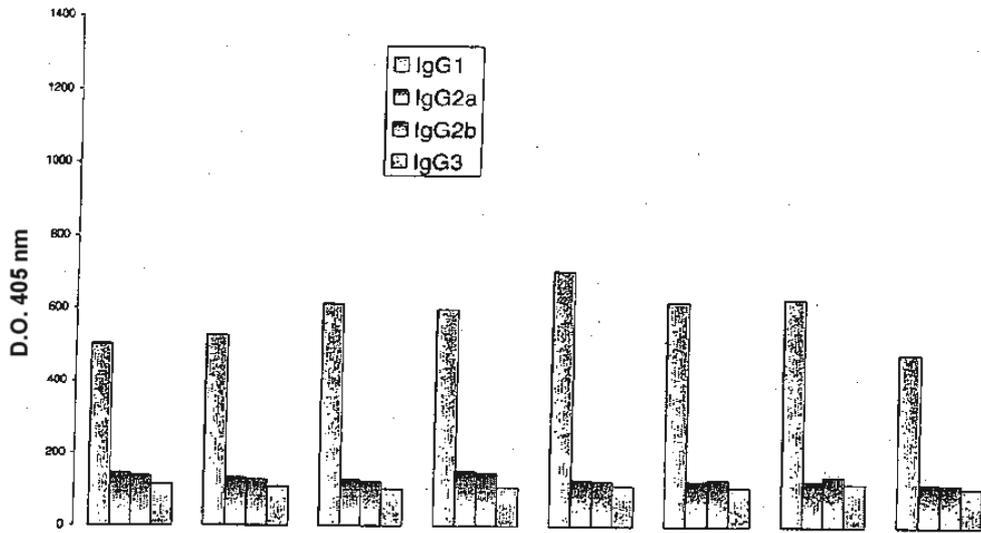


FIGURA 18

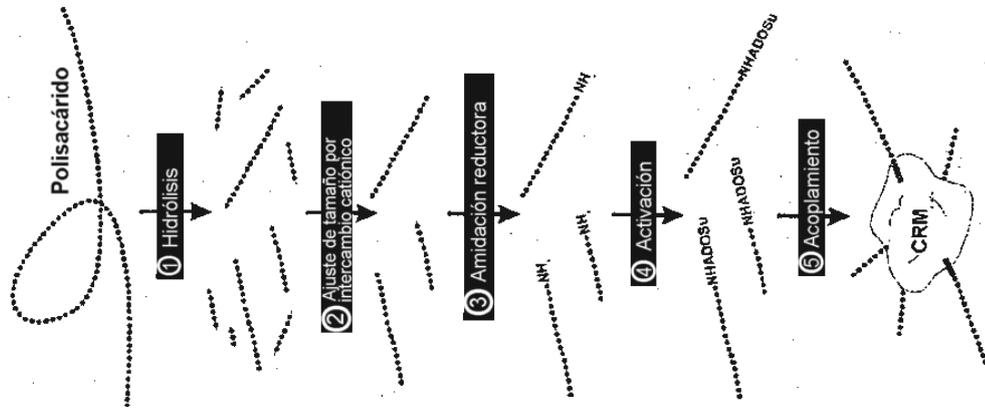


FIGURA 17

IgG 1
 IgG 2a

IgG 2b
 IgG 3

FIGURA 17A

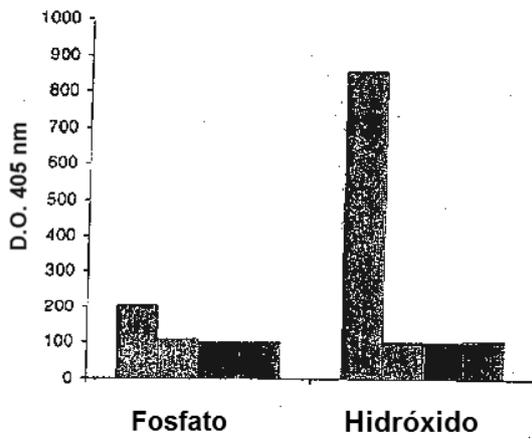


FIGURA 17B

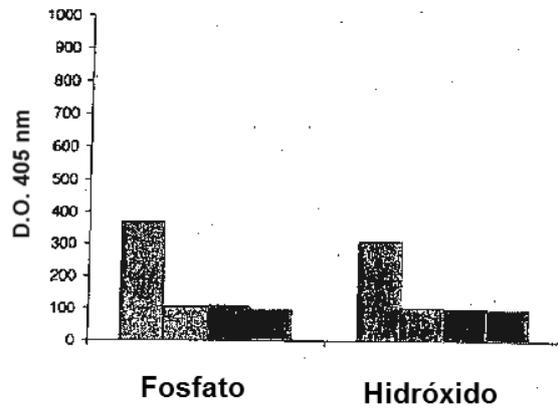


FIGURA 17C

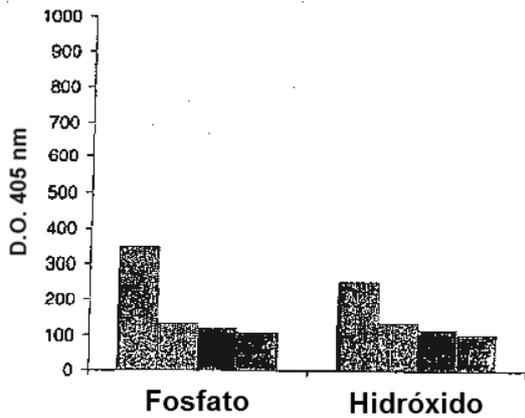


FIGURA 17D

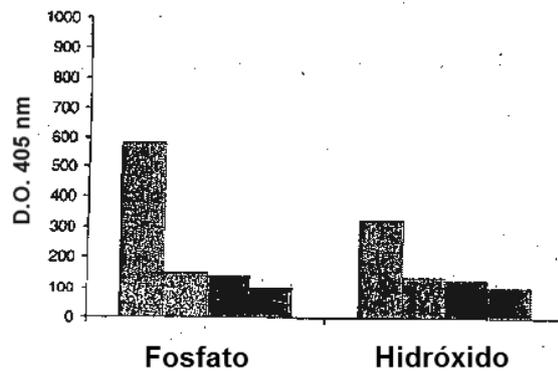


FIGURA 19A

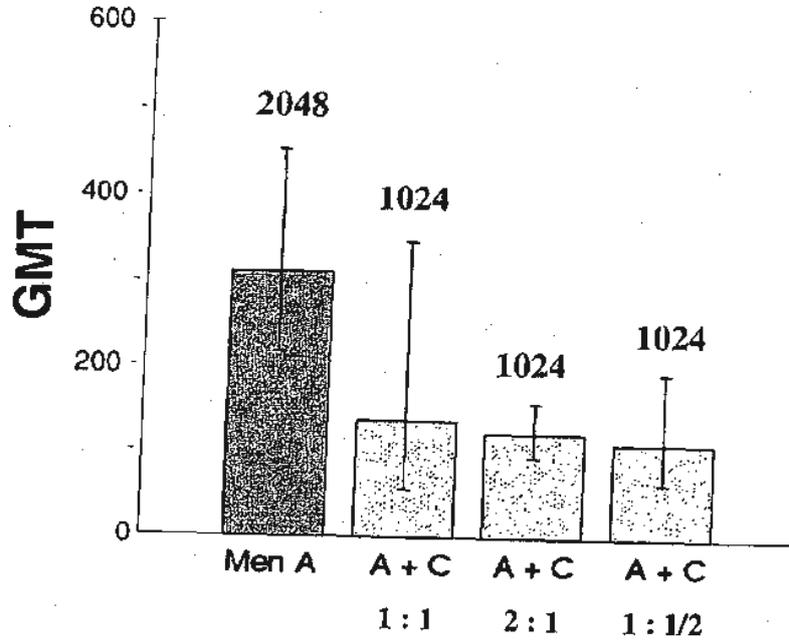


FIGURA 19B

