



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 458**

51 Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C12R 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06075175 .7**
96 Fecha de presentación : **20.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1741442**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2007**

54 Título: **Vacunas combinadas contra *Neisseria meningitidis*.**

30 Prioridad: **20.06.2001 GB 0115176**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2010

73 Titular/es: **Novartis AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

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

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 347 458 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

Vacunas combinadas contra *Neisseria meningitidis*.

5 **Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo de las vacunas, en particular frente a la infección y enfermedad por meningococos.

10 **Técnica antecedente**

Neisseria meningitidis es un patógeno humano Gram negativo. Coloniza la faringe, provocando meningitis y, ocasionalmente, septicemia en ausencia de meningitis. Está estrechamente relacionado con *N. gonorrhoeae*, aunque una característica que diferencia meningococos claramente es la presencia de una cápsula de polisacáridos que está presente en todos los meningococos patógenos.

Se han identificado doce grupos serológicos de *N. meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X y Z) de acuerdo con el polisacárido capsular del organismo. El grupo A es el patógeno implicado más frecuentemente en enfermedades epidémicas en el África sub-Sahariana. Los grupos serológicos B y C son responsables de la gran mayoría de casos en EE. UU. Y en la mayoría de países desarrollados. Los grupos serológicos W135 e Y son responsables de los casos restantes en EE.UU. y países desarrollados.

Los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* se preparan generalmente mediante un procedimiento que comprende las etapas de precipitación del polisacárido (p.ej. utilizando un detergente catiónico), fraccionamiento en etanol, extracción fría de fenol (para eliminar proteínas) y ultracentrifugación (para eliminar LPS) [p.ej. referencia 1].

Una vacuna tetravalente de los polisacáridos de los grupos serológicos A, C, Y, y W135 se conoce hace años [2, 3] y se ha autorizado para uso humano. Aunque efectiva en adolescentes y adultos, induce una respuesta inmune pobre y corta duración de la protección y no se puede utilizar en niños [p.ej. 4]. Ésto es por que los polisacáridos son antígenos independientes de la célula T que inducen una respuesta inmune débil que no se puede estimular. Los polisacáridos en esta vacuna no están conjugados y están presentes a una relación 1:1:1:1 [5] MENCEVAX ACWYTM contiene 50 µg de cada polisacárido purificado una vez reconstituido de su forma liofilizada.

Se han aprobado también los oligosacáridos del grupo serológico C conjugados para su utilización en humanos [p.ej. MenjugateTM; referencia 6]. Sin embargo, se mantiene la necesidad de realizar mejoras en las vacunas conjugadas contra los grupos serológicos A, W135 e Y, y en su manufactura.

Descripción de la invención

La invención proporciona un procedimiento para la purificación de un polisacárido capsular bacteriano, que comprende las etapas de (a) precipitación de dicho polisacárido, seguida de (b) disolución del polisacárido precipitado utilizando etanol. El polisacárido se puede utilizar para preparar vacunas, tales como vacunas conjugadas, en particular contra los grupos serológicos A, W135 e Y de *N. meningitidis*.

45 *Precipitación y disolución por etanol*

Se conocen en el campo muchas técnicas para la precipitación de polisacáridos solubles. Los procedimientos preferidos utilizan uno o más detergentes catiónicos. Los detergentes tienen preferiblemente la siguiente fórmula general:

50



en la que:

R_1 , R_2 y R_3 son iguales o diferentes y cada uno significa alquilo o arilo; o R_1 y R_2 junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico saturado de 5- ó 6- miembros, y R_3 significa alquilo o arilo; o R_1 , R_2 y R_3 junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 5- ó 6- miembros insaturado en el átomo de nitrógeno,

65

ES 2 347 458 T3

R₄ significa alquilo o arilo, y

X⁻ significa un anión.

5 Los detergentes preferidos particularmente para la utilización en el procedimiento son sales de tetrabutilamonio y cetiltrimetilamonio (p. ej. las sales de bromuro). Se prefiere particularmente el bromuro de cetiltrimetilamonio (“CTAB”) [8]. CTAB se conoce también como bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de cetrimonio, Cetavlon y Centimida. Otros detergentes incluyen bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio.

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

La etapa de precipitación puede ser selectiva para polisacáridos, pero se coprecipitarán generalmente otros componentes (p. ej. proteínas, ácidos nucleicos, etc.).

15 El polisacárido precipitado se puede recoger por centrifugación antes de su disolución.

Tras su precipitación, el polisacárido (típicamente en la forma de un complejo con el detergente catiónico) se disuelve. Se prefiere la utilización de un disolvente que sea relativamente selectivo para los polisacáridos con el fin de minimizar los contaminantes (p. ej. proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Se ha encontrado que el etanol es ventajoso a este respecto, y es altamente selectivo para el complejo CTAB-polisacárido. Se pueden utilizar otros alcoholes inferiores (p. ej. metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioles, etc.).

25 Preferiblemente se añade etanol al polisacárido precipitado para obtener una concentración final de etanol (en base al contenido total de etanol y agua) de entre el 50% y 95% (p. ej. alrededor del 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, o alrededor del 90%), y preferiblemente entre 75% y 95%. La concentración final óptima de etanol puede depender del grupo serológico de la bacteria de la que se obtiene el polisacárido.

30 El etanol se puede añadir al polisacárido precipitado en forma pura o se puede añadir en una forma diluida con un disolvente miscible (p. ej. agua). Las mezclas de disolventes preferidas son mezclas de etanol: agua, en una relación preferida de entre alrededor de 70:30 y alrededor de 95:5 (p. ej. 75:25, 80:20, 85:15, 90:10).

Comparado con el procedimiento convencional para preparar polisacáridos capsulares, el procedimiento de precipitación en dos etapas seguido por extracción con etanol es más rápido y más simple.

35 Contrastando con el procedimiento descrito en la referencia 9, el procedimiento utiliza detergentes catiónicos en lugar de detergentes aniónicos. A diferencia del procedimiento de la referencia 10, el polisacárido se redisuelve utilizando etanol, en lugar de por intercambio de cationes utilizando sales de calcio o magnesio. A diferencia del procedimiento de la ref. 11, la precipitación no requiere un soporte inerte poroso. Además, a diferencia de los procedimientos anteriores del campo, se utiliza alcohol para redisolver el polisacárido en lugar de precipitarlo.

El polisacárido capsular bacteriano será generalmente de *Neisseria*. Preferiblemente de *N. meningitidis*, que incluye los grupos serológicos A, B, C, W135 e Y. Los grupos serológicos preferidos son A, W135 e Y.

45 El procedimiento es válido también para preparar polisacáridos capsulares de *Haemophilus influenzae* (particularmente tipo B, o “Hib”) o *Streptococcus pneumoniae* (neumococo).

Procesamiento adicional del polisacárido disuelto

50 El polisacárido se puede tratar adicionalmente para eliminar contaminantes tras su disolución. Esto es particularmente importante en situaciones en las que incluso una contaminación menor no es aceptable (p. ej. para la producción de vacunas humanas). Esto requerirá generalmente uno o más etapas de filtración.

55 Se puede utilizar filtración de profundidad. Ésta es particularmente útil para la clarificación.

Se puede utilizar filtración a través de carbón activado. Ésta es útil para eliminar pigmentos y trazas de compuestos orgánicos. Se puede repetir hasta, por ejemplo, DO_{275nm} < 0,2.

60 Se puede utilizar filtración por tamaño o ultrafiltración.

Una vez filtrado para eliminar contaminantes, el polisacárido se puede precipitar para su tratamiento adicional y/o procesamiento. Esto se puede llevar a cabo convenientemente por intercambio de cationes (p. ej. por la adición de calcio o sales de sodio).

65 El polisacárido se puede modificar químicamente. Por ejemplo, se puede modificar para reemplazar uno o más grupos hidroxilo con grupos bloqueantes. Esto es particularmente útil para MenA [12]. Los polisacáridos del grupo serológico B se pueden N-propionilar [13].

ES 2 347 458 T3

El polisacárido (modificado opcionalmente) se hidrolizará generalmente para formar oligosacáridos. Esto se realiza preferiblemente para dar un grado medio final de polimerización (GP) en el oligosacárido menor 30 (p. ej. entre 10 y 20, preferiblemente alrededor de 10 para el grupo serológico A; entre 15 y 25 para los grupos serológicos W135 e Y, preferiblemente alrededor de 15-20; etc). Se prefieren los oligosacáridos a los polisacáridos para su utilización en vacunas. GP se puede medir convenientemente por cromatografía de intercambio iónico o por ensayos colorimétricos [14].

Si se realiza hidrólisis, el hidrolizado será generalmente separado por tamaño para eliminar oligosacáridos de corta longitud. Esto se puede llevar a cabo de varias formas, tales como ultrafiltración seguida por cromatografía de intercambio iónico. Se eliminan preferiblemente los oligosacáridos con un grado de polimerización menor o igual de aproximadamente 6 para el grupo serológico A, y aquellos menores de aproximadamente 4 se eliminan preferiblemente para los grupos serológicos W135 e Y.

Para aumentar la inmunogenicidad, los polisacáridos u oligosacáridos de la invención se conjugan preferiblemente a un portador (Figura 4). La conjugación a proteínas vehículo es particularmente útil para las vacunas pediátricas [p. ej. referencia 15] y es una técnica bien conocida [p. ej. revisada en las referencias 16 a 24, etc.].

Las proteínas vehículo preferidas son toxinas bacterianas o toxoides, tales como toxoides diftérico o tetánico. El toxoide diftérico CRM₁₉₇ [25, 26, 27] se prefiere particularmente. Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen la proteína de la membrana exterior de *N. meningitidis* [28], péptidos sintéticos [29, 30], proteínas de choque térmico [31, 32], proteínas de pertusis [33, 34], citocinas [35], linfocinas [35], hormonas [35], factores de crecimiento [35], proteínas artificiales que incluyen múltiples epítopos de varios antígenos derivados de patógenos reconocidos por células T CD4⁺ humanas [36], proteína D de *H. influenzae* [37], toxina A o B de *C. difficile* [38], etc. Es posible utilizar mezclas de proteínas vehículo.

Se prefieren conjugados con una relación sacárido: proteína (p/p) de entre 0,5:1 (esto es, exceso de proteína) y 5:1 (esto es, exceso de sacárido), y se prefieren más aquellas con un relación entre 1:1,25 y 1:2,5.

Una única proteína vehículo puede llevar múltiples sacáridos diferentes [39]. Los conjugados se pueden utilizar junto con una proteína vehículo libre [40].

Se puede utilizar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier conector adecuado cuando sea necesario.

El sacárido será activado o hecho funcional generalmente antes de la conjugación. La activación puede incluir, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (p. ej. 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [41, 42]. Otras técnicas adecuadas utilizan carbodiimidas, hidracinas, ésteres activos, norborneno, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; ver también la introducción a la referencia 22).

Las uniones vía un grupo conector se pueden llevar a cabo utilizando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 43 y 44. Un tipo de ligamiento incluye aminación reductora del polisacárido, acoplando el grupo amino resultante con un extremo del grupo conector de ácido adípico, y acoplando entonces una proteína al otro extremo del grupo conector de ácido adípico [20, 45, 46]. Otros conectores incluyen B-propionamida [47], nitrofenil-etilamina [48], haluros de haloacilo [49], uniones glucosídicas [50], ácido 6-aminocaproico [51], ADH [52], grupos C₄ a C₁₂ [53], etc. Se puede utilizar unión directa como una alternativa a la utilización de un conector. Las uniones directas a la proteína pueden incluir oxidación del polisacárido seguida por aminación reductora con la proteína, como se describe en, por ejemplo, las referencias 54 y 55.

Se prefiere un procedimiento que incluya la introducción de grupos amino en el sacárido (p. ej. reemplazando grupos =O terminales con -NH₂) seguido por derivación con un diéster adípico (p. ej. N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico) y reacción con la proteína vehículo.

Tras la conjugación, se pueden separar los sacáridos libres y conjugados. Existen muchos procedimientos adecuados entre los que se incluyen cromatografía hidrofóbica, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [ver también las referencias 56 y 57].

Mezclas y Composiciones que comprenden los sacáridos

Los oligosacáridos, polisacáridos y conjugados descritos en la invención se pueden mezclar con otras moléculas biológicas. Se prefieren las mezclas de sacáridos de más de un grupo serológico de *N. meningitidis* por ejemplo, composiciones que comprenden sacáridos de los grupos serológicos 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 antígenos de sacáridos individuales no se retire mediante combinación de ellos, aunque la inmunogenicidad real (por ejemplo, títulos de ELISA) se pueden reducir.

Cuando se usa un sacárido del grupo serológico C, éste preferiblemente tiene entre -12 y -22 unidades de repetición.

Se pueden conjugar sacáridos de diferentes grupos serológicos de *N. meningitidis* con las mismas o diferentes proteínas vehículo.

ES 2 347 458 T3

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

5

Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares (por ejemplo, oligosacáridos) del grupo serológico W135 y al menos uno de los grupos serológicos A, C y Y, sorprendentemente se ha encontrado que la inmunogenicidad del sacárido MenW135 es mayor cuando se administra con el (los) sacárido(s) del (de los) otro(s) grupo(s) serológico(s) que cuando se administra solo (a la misma dosificación *etc.*) [*et. ref.* 58]. De este modo la capacidad del antígeno MenW135 de provocar una respuesta inmune es mayor que la respuesta inmune provocada por una cantidad equivalente del mismo antígeno cuando se administra sin la asociación con los antígenos de los otros grupos serológicos. Tal inmunogenicidad potenciada se puede determinar mediante la administración del antígeno MenW135 para controlar animales y la mezcla para ensayar animales y comparar los títulos de anticuerpo contra los dos usando ensayos convencionales como títulos bactericidas, radioinmunoensayo y de ELISA *etc.* Las vacunas que comprenden combinaciones de sacáridos del grupo serológico W135 y otros grupos serológicos son inmunológicamente ventajosas. Permiten respuestas potenciadas de anti-W135 y/o dosis inferiores de W135.

10

Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares del grupo serológico Y y uno o ambos grupos serológicos C W135, Se prefiere que la relación (p/p) de sacárido MenY: sacárido MenW135 es mayor que 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 es menor que 1 (*por ejemplo*, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, o inferior).

20

Las relaciones preferidas (p/p) para los sacáridos de los grupos serológicos 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.

25

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

30

Los antígenos no meningocócicos y no *Neisseria*, preferiblemente son los que no disminuyen la respuesta inmune contra los componentes meningocócicos, también se pueden incluir. Ref. 69, *por ejemplo*, describe combinaciones de oligosacáridos de grupos serológicos B y C de *N. meningitidis* conjuntamente con el sacárido de Hib. Se prefieren los antígenos de neumococos, virus de hepatitis A, virus de hepatitis B, *B. pertussis*, difteria, tétanos, *Helicobacter pylori*, polio y/o *H. influenzae*. Los antígenos no *Neisseria* incluyen:

35

- 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 sacárido antígeno de *Streptococcus pneumoniae* [*por ejemplo*, 80, 81,82].

40

- un antígeno de virus de hepatitis A, tal como virus inactivado [*por ejemplo*, 83, 84].

- un antígeno de virus de hepatitis B, tal como antígenos de superficie y/o de núcleo [*por ejemplo*, 84, 85], adsorbiéndose preferiblemente con antígeno se superficie sobre un fosfato de aluminio [86].

45

- un sacárido antígeno de *Haemophilus influenzae* B [*por ejemplo*, 87], preferiblemente no adsorbido o adsorbido sobre un fosfato de aluminio [88].

- un antígeno de virus de hepatitis C [*por ejemplo*, 89].

50

- un antígeno de *N. gonorrhoeae* [*por ejemplo*, 59 a 62].

- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [*por ejemplo*, refs. 90 a 96].

- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [*por ejemplo*, 97].

55

- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [*por ejemplo*, 98].

- antígeno(s) de polio [*por ejemplo*, 99, 100] tal como IPV.

60

- antígeno(s) de rabia [*por ejemplo*, 101] tal como virus inactivado liofilizado [*por ejemplo*, 102, RabAvert™].

- antígenos de sarampión, paperas y/o rubeola [*por ejemplo*, capítulos 9, 10 y 11 de ref. 103].

65

- antígenos de influenza [*por ejemplo*, capítulo 19 de ref. 103], tales como las proteínas de superficie de hemaglutinina y/o neuraminidasa.

- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [*por ejemplo*, 104].

ES 2 347 458 T3

- un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos grupo B) [por ejemplo, 105, 106].
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos grupo A) [por ejemplo, 106, 107, 108].
- 5 - un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 109].
- antígeno(s) de un paramixovirus tal como un virus sincitial respiratorio (RSV [110, 111]) y/o virus de parainfluenza (PIV3 [112]).
- 10 - un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo, 113, 114, 115].
- un antígeno de un virus de la familia flaviviridae (género flavivirus), tal como de virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis Japonesa, cuatro serotipos de virus Dengue, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, virus del Nilo del Oeste.
- 15 - un antígeno de pestivirus, tal como virus de la fiebre porcina clásica, virus de diarrea viral bovina, y/o virus de la enfermedad de la frontera.
- un antígeno de parvovirus por ejemplo, de parvovirus B 19.
- 20 - un toxoide de tétanos [por ejemplo, ref. 116].
- holotoxina de pertussis (PT) y filamentous hemagglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, refs. 117 & 118].
- 25 - antígeno de pertussis celular.

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

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

Antígenos en la mezcla estarán típicamente 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 inmune contra ese antígeno.

Como una alternativa para usar antígenos de proteínas en la mezcla, se puede usar ácido nucleico que codifica el antígeno. De este modo se pueden reemplazar componentes de proteína de la mezcla por ácido nucleico (preferiblemente ADN por ejemplo, en la forma de un plásmido) que codifica la proteína.

45 *Vacunas de sacárido multivalentes*

También se describen vacunas y composiciones inmunogénicas que comprenden sacáridos capsulares de al menos dos (es decir, 2, 3 o 4) de grupos serológicos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*, en los que los sacáridos capsulares están conjugados a proteína(s) vehículo y/o son oligosacáridos. Cuando la vacuna tiene solamente oligosacáridos o polisacáridos conjugados de los grupos serológicos A, C, W135 e Y, éstos no son preferiblemente de los grupos serológicos A y C (et. refs. 66, 119 y 120). Las composiciones preferidas comprenden sacáridos de los grupos serológicos C e Y. Otras composiciones preferidas comprenden sacáridos de los grupos serológicos C, W135 e Y.

También se describe una composición inmunogénica que comprende un conjugado del oligosacárido del grupo serológico A y un conjugado del oligosacárido del grupo serológico C, y que comprende además (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 preferiblemente un tampón fosfato; cuando comprende un adyuvante de hidróxido de aluminio, el tampón es preferiblemente un tampón histidina.

Quando la vacuna comprende un sacárido capsular del grupo serológico A, Se prefiere que el sacárido del grupo serológico A se combine con el (los) otro(s) sacárido(s) poco tiempo antes de uso, con el fin de minimizar la hidrólisis (véanse los sacáridos Hib). Esto se puede lograr de manera conveniente teniendo el componente del grupo serológico en forma liofilizado y el (los) otro(s) componente(s) del grupo serológico en forma líquida, usándose el componente líquido para reconstituir el componente liofilizado cuando está listo para uso. El componente líquido preferiblemente comprende un adyuvante de sal de aluminio, mientras que el componente del grupo serológico A puede o no puede comprender un adyuvante de sal de aluminio.

De este modo la invención proporciona un kit que comprende: (a) un sacárido capsular conjugado del grupo serológico A de *N. meningitidis*, en forma liofilizada; y (b) sacárido(s) capsular(es) de uno o más (*por ejemplo*, 1, 2, 3) de grupos serológicos C, W135 e Y de *N. meningitidis*, en forma líquida. Los sacáridos están preferiblemente conjugados a proteína(s) vehículo y/o son oligosacáridos. El kit puede tener la forma de dos viales.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar una vacuna que comprende sacáridos capsulares conjugados de al menos dos de grupos serológicos A C. W135 e Y de *N. meningitidis*, que comprende una etapa de mezclar (i) conjugado liofilizado de sacárido capsular de grupo serológico A de *N. meningitidis* con (ii) conjugado(s) en forma líquida de sacárido(s) capsular(es) de uno o más (*por ejemplo*, 1, 2, 3) de grupos serológicos C, W135 e Y de *N. meningitidis*. También se describe un kit que comprende: (a) oligosacárido capsular conjugado del grupo serológico A de *N. meningitidis*, en forma liofilizada; y (b) uno o más antígenos adicionales en forma líquida. El antígeno adicional puede o no puede ser oligosacárido capsular conjugado de grupo serológico C de *N. meningitidis*.

Composiciones inmunogénicas y vacunas

Los polisacáridos, oligosacáridos y conjugados de la invención son particularmente adecuados para su inclusión en composiciones inmunogénicas y vacunas. Un procedimiento de la invención puede por tanto incluir la etapa de formulación del polisacárido, oligosacárido o conjugado como una composición inmunogénica o vacuna. En el presente documento se describe una composición o vacuna que se puede obtener de esta manera

Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la invención, además de sacáridos meningocócicos, incluirán generalmente “vehículos farmacéuticamente aceptables”, que incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que reciba la composición. Los vehículos adecuados son generalmente macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, trehalosa [121], agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas), partículas virales inactivas. Tales vehículos son bien conocidos por aquellos que trabajan habitualmente en el campo. Las vacunas pueden contener también diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras de pH, y similares. Una discusión detallada de excipientes aceptables farmacéuticamente está disponible en la referencia 122.

Las composiciones inmunogénicas utilizadas como vacunas incluyen una cantidad efectiva del sacárido antigénico, así como cualquier otro de los componentes mencionados anteriormente, según necesidad. Por “cantidad inmunológicamente efectiva” se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo que va a ser tratado, edad, grupo taxonómico del individuo que va a ser tratado (p. ej. primate no humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseada, la formulación de la vacuna, la valoración de la situación médica por doctor que atiende, y de otros factores relevantes. Es esperable que la cantidad caiga dentro de un rango relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios. La dosificación del tratamiento se puede realizar en una pauta de una única dosis o en una pauta de múltiples dosis (p. ej. Incluyendo dosis de recuerdo). La vacuna se puede administrar conjuntamente con otros agentes inmunorreguladores.

La vacuna se puede administrar conjuntamente con otros agentes inmunorreguladores.

La vacuna puede incluir un adyuvante. Los adyuvantes preferidos para potenciar la efectividad de la composición incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de aluminio (alum), tales como hidróxidos de aluminio (incluyendo oxihidróxidos), fosfatos de aluminio (incluyendo hidroxifosfatos), sulfato de aluminio, etc. [Capítulos 8 y 9 en la referencia 123]; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos, tales como muramilpéptidos [Muramilpéptidos incluyen N-acetyl-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamunil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.] o componentes de paredes bacterianas), como por ejemplo (a) MF59TM [Capítulo 10 en la referencia 123; 124, 125], que contiene 5% de Escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85 (opcionalmente conteniendo MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador, (b) SAF, que contiene 10% de Escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 bloqueado con pluronic, y thr-MDP bien en una emulsión submicrométrica por la acción de microfluidificador o en una emulsión de partículas de mayor tamaño por la acción de un agitador “vortex”, y (c) sistemas de adyuvante RibiTM (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2% de Escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de paredes bacterianas del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared bacteriana (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoxTM); (3) adyuvantes de saponina [capítulo 22 de la referencia 123], tales como QS21 o StimulonTM (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), bien en forma sencilla o en forma de partículas generadas de ellos tales como ISCOMs (complejos inmunoestimuladores; capítulo 23 de la referencia 123), cuyos ISCOMs podrían estar desprovistos de detergente adicional p. ej. referencia 126; (4) Adyuvante Completo de Freund (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA); (5) citocinas, tales como interleucinas (p. ej. IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [127], etc.), interferones (p. ej. interferón gama), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (6) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-deacilado (3dMPL) p. ej. referencias 128 y 129, opcionalmente en la ausencia sustancial de sales de aluminio cuando se usa con sacáridos de pneumococo p. ej. referencia 130; (7) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo,

ES 2 347 458 T3

QS21 y/o emulsiones de aceite en agua p. ej. referencias 131, 132 y 133; (8) oligonucleótidos que incluyen motivos CpG (Roman *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3: 849-854; Weiner *et al.*, *PNAS EE.UU.*, 1997, 94: 10833-10837; Davis *et al.*, *J. Immunol.* 1998, 160: 870-876; Chu *et al.*, *J. Exp. Med.* 1997, 186: 1623-1631; Lipford *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27: 2340-2344; Moldoveanu *et al.*, *Vaccine*, 1988, 16: 1216-1224, Krieg *et al.*, *Nature*, 1995, 374: 546-549;

5 Klinman *et al.*, *PNAS EE.UU.*, 1996, 93: 2879-2883; Ballas *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157: 1840-1845; Cowdery *et al.*, *J. Immunol.* 1996, 156: 4570-4575; Halpern *et al.*, *Cell. Immunol.*, 1996, 167: 72-78; Yamamoto *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79: 866-873; Stacey *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157: 2116-2122; Messina *et al.*, *J. Immunol.*, 1991, 147: 1759-1764; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157: 4918-4925; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157: 5394-5402; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160: 4755-4761; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160: 5898-5906; Solicitudes de patentes internacionales WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581)

10 esto es, que contienen al menos un dinucleótido CG, con 5-metilcitosina opcionalmente en lugar de citosina; (8) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno p. ej. referencia 134; (9) un surfactante éster sorbitan polioxietileno en combinación con octoxinol [135] o un éter alquil polioxietileno o éster surfactante en combinación con al menos un surfactante adicional no iónico tal como un octoxinol [136]; (10) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador (p. ej. un oligonucleótido CpG) [137]; (11) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica p. ej. ref. 138; (12) una saponina y una emulsión de aceite en agua p. ej. ref. 139; (13) una saponina (p. ej. QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) p. ej. ref. 140; (14) enterotoxina lábil al calor de *E. coli* ("LT"), o mutantes no tóxicos de la misma, tales como los mutantes K63 o R72 [p. ej. Capítulo 5 de ref. 141]; (15) toxina colérica ("CT"), o mutantes no tóxicos de la misma [p. ej. Capítulo 5 de ref. 141]; (16) liposomas [Capítulos 13 y 14 de ref. 123]; (17) quitosán [p. ej. 142]; (18) RNA de doble hélice; (19) micropartículas (p. ej. una partícula de ~100 nm a ~150 μ m de diámetro, más preferiblemente de ~200 nm a ~30 μ m, y más preferiblemente de ~500 nm a ~10 μ m de diámetro) formada por materiales que son biodegradables y no tóxicos (p. ej. un poli(ácido α -hidroxi) tal como un poli(lactido-co-glicolido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhidrido, una policaprolactona, etc.) opcionalmente

20 tratados para tener una superficie negativamente cargada (p. ej. con SDS) o una superficie positivamente cargada (p. ej. un detergente catiónico, tal como CTAB); o (20) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para aumentar la efectividad de la composición [p. ej. Capítulo 7 de ref. 123].

Se prefieren las sales de aluminio (especialmente fosfatos y/o hidróxidos de aluminio) y MF59 para su uso con los antígenos sacáridos de la presente invención. Cuando se usa un fosfato de aluminio, es posible adsorber uno o más de

30 los sacáridos a la sal de aluminio, pero es preferible no adsorber los sacáridos a la sal, y esto se favorece incluyendo iones fosfato libres en solución (p. ej. mediante la utilización de un tampón fosfato). Cuando se utiliza un hidróxido de aluminio, es preferible adsorber los sacáridos a la sal. La utilización de hidróxido de aluminio como adyuvante es particularmente ventajosa para los sacáridos del grupo serológico A.

35 En composiciones de la invención es posible adsorber algunos antígenos a un hidróxido de aluminio y tener otros antígenos en asociación con un fosfato de aluminio. En el caso de combinaciones tetravalentes de los grupos serológicos de *N. meningitidis*, por ejemplo, están disponibles las siguientes permutaciones:

| Grupo serológico | Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato) | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | P | H | P | H | H | H | P | P | P | H | H | H | P | P | P | H |
| 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 |

55 Para combinaciones trivalentes de los grupos serológicos de *N. meningitidis*, están disponibles las siguientes permutaciones:

| Grupo serológico | 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 |

ES 2 347 458 T3

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al individuo. Los individuos a tratar pueden ser animales; en particular, se pueden tratar individuos humanos. Las vacunas son particularmente útiles para vacunar a niños y adolescentes. Se pueden administrar por vías sistémicas o de mucosas.

5 Típicamente, las composiciones inmunogénicas se preparan como inyectables, bien como soluciones líquidas o como suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para obtener soluciones o suspensiones en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas para favorecer el efecto adyuvante. La administración directa de las composiciones será en general por vía parenteral (p. ej. por inyección, bien subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular o administrada en el espacio intersticial de un tejido). Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. Otros modos de administración incluyen administración oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdermales o transcutáneas (p. ej. véase la referencia 143), agujas e “hyposprays”. La dosificación del tratamiento puede ser en una pauta de una única dosis o en una pauta de múltiples dosis (p.ej. incluyendo dosis de recuerdo).

15 Las vacunas de la invención son preferiblemente estériles. Están preferiblemente libres de pirógenos. Están preferiblemente tamponadas p. ej. entre pH 6 y pH 8, preferiblemente pH 7. Cuando la vacuna incluya una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere la utilización de un tampón histidina [144].

20 Las vacunas de la invención pueden incluir bajos niveles (p. ej. < 0,01%) de un detergente (p. ej. un Tween, tal como Tween 80). Las vacunas de la invención pueden incluir un polialcohol (p. ej. manitol) o trehalosa p. ej. a aproximadamente 15 mg/ml, particularmente si tienen que estar liofilizadas.

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

Las vacunas descritas en el presente documento pueden ser o bien profilácticas (esto es, para prevenir la infección) o terapéuticas (esto es, para tratar la enfermedad después de la infección), pero generalmente son profilácticas.

30 La vacuna puede ser para uso en un procedimiento de incremento de de una respuesta inmune en un paciente, que comprende la administración de a un paciente la vacuna. La respuesta inmune es preferiblemente protectora contra enfermedad meningocócica, y puede comprender una respuesta inmune humoral y/ o una respuesta inmune celular. El paciente es preferiblemente un niño.

35 El procedimiento puede incrementar una respuesta de refuerzo, en un paciente que ya se ha cebado contra *N. meningitidis*.

40 También se contempla el uso de un polisacárido, oligosacárido o conjugado descrito en el presente documento para la fabricación de un medicamento para incrementar una respuesta inmune en un animal. El medicamento es preferiblemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad provocada por *Neisseria* (e.g. meningitis, septicemia, gonorrea etc.), por *H. influenzae* (por ejemplo, otitis media, bronquitis, neumonía, celulitis, pericarditis, meningitis etc.) o por neumococcus (por ejemplo, meningitis, sepsis, neumonia etc). Se prefiere de esta manera la prevención y/o tratamiento de meningitis bacteriana.

45 Las vacunas se pueden probar en modelos animales estándar (p. ej. ver ref. 145).

La invención proporciona también un procedimiento para la disolución de un polisacárido capsular bacteriano, precipitado con uno o más detergentes catiónicos, en el que se utiliza como disolvente el etanol.

50 Definiciones

55 El término “que comprende” significa “que incluye” así como que “que consiste” p. ej. una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional p. ej. X + Y.

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

Breve descripción de las figuras

60 La figura 1 muestra el efecto de las variaciones de la relación etanol: agua en la disolución de los polisacáridos.

Las figuras 2 a 4 muestran las titulaciones de IgG obtenidas en ratones contra antígenos de oligosacáridos: La Figura 2 muestra los resultados de oligosacárido del grupo serológico A; La Figura 3 muestra los resultados para el grupo serológico Y; y la Figura 4 muestra los resultados para el grupo serológico W135.

65 La figura 5 muestra las titulaciones post-II IgG obtenidos en ratones con una mezcla de conjugados de oligosacáridos para los grupos serológicos A y C: La figura 5a muestras las respuestas de anti-grupo serológico A; y La figura 5b muestras las respuestas de anti-grupo serológico C.

ES 2 347 458 T3

Las figuras 6 a 8 muestran los títulos de IgG obtenidos en ratones con una mezcla de conjugados de oligosacáridos para los grupos serológicos C, W 5 135 e Y: la figura 6 muestra las respuestas del anti-grupo serológico W135; la figura 7 muestra las respuestas del anti-grupo serológico Y; y la figura 8 muestra las respuestas del anti-grupo serológico C.

5 Las figuras 9 a 11 muestran las titulaciones post-II IgG obtenidas en ratones con una mezcla de conjugados de oligosacáridos para los grupos serológicos A, C, W135 e Y: la figura 9 muestra las respuestas de anti-grupo serológico W135; la figura 10 muestra las respuestas de anti-grupo serológico Y; y la figura 11 muestra las respuestas de anti-grupo serológico A.

10 La figura 12 es una curva de calibración obtenida utilizando el ensayo de muestras de polisacárido MenA a diferentes tiempos de hidrólisis. La curva muestra la relación lineal entre el recíproco del grado de polimerización y poder rotatorio óptico.

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

20 La figuras 14 a 16 muestran las titulaciones post-II IgG, divididas por la subclase IgG, obtenidas en ratones después de la inmunización con conjugados de oligosacáridos para los grupos serológicos: (14) A; (15) C; (16) W135 y (17) Y.

La figura 17 muestra titulaciones post-II IgG, divididas por la subclase IgG, obtenidas en ratones después de la inmunización con una mezcla tetravalente de conjugados de oligosacáridos.

25 La figura 18 ilustra la preparación de un conjugado de oligosacáridos.

La figura 19 muestra (A) anti-MenA y (B) anti-MenC GMT \pm 95% de intervalos de confianza) obtenido en un modelo de cobaya. Las barras de valores anteriores son valoraciones de ensayo bactericida en suero (SBA) es decir el recíproco de la dilución en suero que produce el 50% de muerte.

30

Formas para la realización de la invención

A. Producción y purificación de polisacáridos meningocócicos

35 Los meningococos de los grupos serológicos A, W135 e Y se crecieron en frascos de 500 ml que contenían 150 ml de medio Franz A, durante 12 h a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Se estableció agitación a 150 rpm utilizando un agitador orbital de 35 mm. Después se inocularon 85 ml en un fermentador de 20 l que contenía medio Watson.

40 Después de 18,5 horas (W135 e Y) o 16,5 horas (A), cuando se alcanzó una OD = 10, se interrumpió la fermentación por la adición de 300 ml de formalina y entonces, tras 2 horas de incubación, el fermentador se enfrió a 10°C . Se recogió el sobrenadante por centrifugación seguido de filtración ($0,22 \mu\text{m}$) y ultrafiltración con una membrana de 30 kDa.

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

50

| Grupo serológico | Volumen de CTAB (ml) | Volumen de 95% de etanol (litros por Kg de pasta seca) |
|------------------|----------------------|--|
| A | 475 | 3,5 a 6 |
| W135 | 200 | 4 a 6 |
| Y | 650 | 3,4 |

60

65 Las suspensiones resultantes se filtraron a través de un filtro CUNO de 10 SP de profundidad. El filtrado se recirculó a través de un cartucho CUNO zetacarbon™ hasta una OD_{275 nm} < 0,2. El filtrado de Z carbono se recogió entonces y se filtró a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$. El polisacárido se precipitó finalmente de la fase de etanol por adición de una solución de CaCl₂ 2M en agua (de 10-12 ml/l de EtOH solución final). El polisacárido purificado se obtuvo por centrifugación, se lavó con 95% de etanol y se secó bajo vacío.

ES 2 347 458 T3

En otros experimentos, se modificó la concentración final de etanol utilizada para la extracción (Figura 1). Para el polisacárido del grupo serológico A, el rango de etanol más efectivo fue entre 80 y 95%, con una eficiencia de extracción decreciente a porcentajes menores. Para el grupo serológico W135, se alcanzó una buena extracción con entre el 75% y el 95% de etanol, siendo 95% menos efectivo. Para el grupo serológico Y, los mejores resultados se obtuvieron con etanol entre el 75% y el 85%, siendo altos porcentajes (p. ej. 90%, 95%) menos efectivos. En general, se observó que los porcentajes de etanol por debajo de los expuestos aquí tendían a incrementar la co-extracción de contaminantes tales como proteínas. Los porcentajes de etanol dados en este párrafo se expresaron como concentración final (etanol como porcentaje del volumen total de etanol + agua) y se basan en un contenido de agua en las pastas de CTAB-polisacárido recuperadas por centrifugación de aproximadamente el 50% (esto es, 500g de H₂O por Kg de pasta seca). Este valor se determinó empíricamente en experimentos a pequeña escala.

B. Conjugación de los polisacáridos del grupo serológico A

a) Hidrólisis

El polisacárido del grupo serológico A meningocócico se hidrolizó en 50 mM de tampón acetato sódico, pH 4,7 durante aproximadamente 3 horas a 37°C. La hidrólisis se controló con el fin de obtener oligosacáridos con un grado medio de polimerización (GP) de aproximadamente 10, como se determinó por la relación (p/p) entre el fósforo orgánico total y el fosfato monoéster.

La relación DP (de fósforo orgánico total) a (fósforo monoéster) es inversamente proporcional a la capacidad de rotación óptica (α), como se muestra en la Figura 12. Esta relación se puede utilizar para medir la extensión de la hidrólisis más convenientemente que las medidas directas de fósforo.

b) Selección por tamaño

Esta etapa elimina los oligosacáridos de corta longitud generados durante el procedimiento de hidrólisis. El hidrolizado obtenido anteriormente se ultrafiltró a través de una membrana con un límite de exclusión de 30 kDa (12 volúmenes de diafiltración de tampón acetato 5 mM, pH 6,5). El retenido, que contiene los productos de alto peso molecular (PM), se descartó. El permeado se cargó en una columna Q-Sepharose Fast Flow equilibrada en tampón acetato 5 mM, pH 6,5. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna (VC) de tampón equilibrado, después con 10 VC de tampón acetato 5 mM/NaCl 125 mM, pH 6,5 con el fin de eliminar oligosacáridos con GP \leq 6. El oligosacárido seleccionado por tamaño se eluyó entonces con 5 VC de tampón acetato 5 mM/NaCl 0,5 M, pH 6,5.

La población de oligosacáridos eluidos tenía un GP medio de aproximadamente 15.

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

Se añadió una sal de amonio (acetato o cloruro) a la disolución del oligosacárido seleccionado por tamaño a una concentración final en un intervalo de 49-300 g/l, posteriormente se añadió ciano borohidruro de sodio a una concentración final en un intervalo 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 se purificaron entonces por ultrafiltración de flujo tangencial o con una membrana con un límite de exclusión de un 1kDa ó 3kDa utilizando 13 volúmenes de diafiltración de NaCl 0,5 M seguido por 7 volúmenes de diafiltración de NaCl 20 mM. El contenido de fósforo (una actividad química del antígeno) de la solución de amino-oligosacárido purificada se analizó por el procedimiento de la ref. 146 y la cantidad de grupos amino introducidos por el procedimiento de la ref. 147.

Los oligosacáridos purificados se secaron entonces en un evaporador rotatorio para eliminar el agua.

d) Derivación a éster activo

Los amino-oligosacáridos secados se disolvieron en agua destilada a una concentración de grupos amino 40 mM, entonces se añadieron 9 volúmenes de DMSO seguidos por trietilamina a una concentración final de 200 mM. A la solución resultante se le añadió N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico a una concentración de 480 mM.

La reacción se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, entonces el oligosacárido activado se precipitó con acetona (concentración final de 80% v/v). El precipitado se recuperó por centrifugación y se lavó varias veces con acetona para eliminar el N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico y productos secundarios. Finalmente, el oligosacárido activado se secó bajo vacío.

La cantidad de grupos éster activos introducidos en la estructura del oligosacárido se determinó por un procedimiento colorimétrico como se describió en la ref. 148.

e) Conjugación a CRM₁₉₇

El oligosacárido activado seco se añadió a una solución de 45 mg/ml de CRM₁₉₇ en tampón fosfato 0,01M, pH 7,2 para una relación de éster/proteína (mol/mol) de 12:1. La reacción se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente

ES 2 347 458 T3

toda la noche. Después de este periodo, el conjugado se purificó por cromatografía hidrofóbica o ultrafiltración de flujo tangencial. El conjugado MenA-CRM₁₉₇ se esterilizó por filtración y se almacenó a -20°C ó -60°C hasta la formulación de la vacuna.

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

| Código del 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 |
| 210201/BL | 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 seleccionado por tamaño) | 0,08 | 0,291 | 0,27 | |
| A2 (seleccionado por tamaño) | 0,446 | 2,421 | 0,18 | |

35 C. Conjugación de polisacáridos del grupo serológico W135

a) Hidrólisis

40 El polisacárido de grupo meningocócico W se hidrolizó en tampón acetato sódico 50 mM, pH 4,7 durante aproximadamente 3 horas a 80°C. Esto resultó en oligosacáridos con un GP medio de aproximadamente 15 a 20 según se determinó por la relación entre ácido siálico (AS) y AS reducido terminal.

45 La relación de GP (AS total) a (AS reducido terminal) está relacionada con la KD determinada por HPLC-SEC, como se muestra en la Figura 3. Esta relación se puede utilizar para monitorizar la extensión de la hidrólisis de forma más conveniente que las medidas directas de AS.

b) Separación por tamaño

50 El hidrolizado se ultrafiltró a través de una membrana con un límite de exclusión de 30 kDa (12 a 20 volúmenes de diafiltración de tampón acetato 5 mM/NaCl 15-30 mM, pH 6,5). La fracción retenida, que contiene los productos de alto PM, se descartó mientras que la fracción permeable se cargó en un columna Q-Sepharose Fast Flow equilibrada con tampón acetato 5 mM/ NaCl 15 mM, pH 6,5. La columna se lavó entonces con 10 VC de tampón equilibrado, con el fin de eliminar oligosacáridos con GP ≤ 3-4 y se eluyó con 3 VC de tampón acetato 5 mM/NaCl 500 mM, pH 6,5.

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

55 Se añadió cloruro amónico o acetato amónico a la solución de oligosacáridos seleccionados por tamaño hasta una concentración final de 300 g/l, entonces se añadió ciano borohidruro de sodio a una concentración final de 49 g/l ó 73 g/l. La mezcla se incubó a 50°C durante 3 días.

60 Los amino-oligosacáridos se purificaron entonces por ultrafiltración de flujo tangencial como se describió para el serogupo A. Se analizó el contenido de ácido siálico del material purificado (procedimiento colorimétrico de acuerdo a la re. 149 y/o galactosa (HPLC) (actividades químicas del antígeno MenW135). Los oligosacáridos purificados se secaron con un evaporador rotatorio para eliminar el agua.

65 d) Derivación a éster activo

Los amino-oligosacáridos secos se derivaron como se describió anteriormente para el grupo serológico A.

ES 2 347 458 T3

e) Conjugación a CRM₁₉₇

La conjugación se realizó como se describió anteriormente para el grupo serológico A pero, se utilizó diafiltración con una membrana de 30 kDa para purificar el conjugado (50 volúmenes de diafiltración de tampón fosfato 10 mM, pH 7,2). El conjugado purificado se esterilizó por filtración y se almacenó a -20°C ó -60°C hasta la formulación de la vacuna.

El conjugado se analizó para los mismos parámetros descritos anteriormente para el grupo serológico A. El contenido de sacárido MenW se analizó por determinación colorimétrica de ácido siálico:

| Código del lote | Sacárido 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 |

D. Conjugación de polisacáridos del grupo serológico Y

a) Hidrólisis

El polisacárido meningocócico del grupo Y se hidrolizó como se describió anteriormente para el sorogrupo W135. Esto generó oligosacáridos con un GP medio de aproximadamente 15 a 20 como se determinó por la relación entre AS y AS reducido terminal (medido indirectamente convenientemente como se describió bajo C(a) anteriormente).

b) Selección por tamaño, c) Introducción de grupos amino, d) Derivación a éster activo y e) Conjugación

Estas etapas se realizaron como se describió anteriormente para el grupo serológico W135. El conjugado purificado se esterilizó por filtración y se almacenó a -20°C ó -60°C hasta la formulación de la vacuna.

El conjugado se analizó de la misma forma que se describió anteriormente para el grupo serológico W135:

| Código del lote | Sacárido 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

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

Se preparó un segundo conjunto de vacunas para cada grupo serológico de la misma forma, excepto que la adición de fosfato de aluminio se reemplazó con el mismo volumen de agua.

Diez ratones Balb/c se inyectaron para cada grupo de inmunización s.c. dos veces con 0,5 ml de vacuna en las semanas 0 y 4. Se tomaron muestras de sangre antes de la inmunización, el día antes de la segunda dosis y 2 semanas después de la segunda dosis. Las inmunizaciones se realizaron con (a) la vacuna conjugada con o sin alumbre, (b) control de solución salina y (c) control de polisacárido no conjugado.

ES 2 347 458 T3

Anticuerpos de IgG anti-polisacáridos específicos se determinaron en el suero de animales inmunizados como se describe en la ref. 150. Cada suero de ratón individual se analizó por duplicado mediante una curva de valoración y se calculó GMT para cada grupo de inmunización. Los títulos se calcularon en Unidades Elisa de Ratón (MEU) usando el software "Titerun" (FOA). La especificidad de titulación anti-polisacárido se determinó mediante ELISA competitivo con el polisacárido relevante como competidor.

Como se muestra en la Figura 2, el conjugado MenA indujo altas titulaciones de anticuerpo en anticuerpo. Como se espera, el polisacárido no conjugado era no inmunogénico. La formulación conjugada con un fosfato de aluminio como adyuvante indujo un alto nivel de anticuerpos comparado con la titulación obtenida por el conjugado solo. Se observaron resultados similares para MenY (Figura 3) y MenW135 (Figura 4).

La subclase IgG de las respuestas post-II inmunes se midió para varios grupos. Las subclases específicas se determinaron usando el mismo procedimiento ELISA como se usó para la determinación del título IgG total en la sección E anterior, excepto que se usa fosfatasa alcalina-anti ratón -IgG1, -IgG2a, -IgG2b o -IgG3 (Zymed) como el anticuerpo secundario. Los títulos se expresaron DO_{405nm} obtenidos después de 30 minutos de desarrollo de sustrato usando suero diluido 1:3200, y se muestran en las Figuras 14 (MenA), 15 (MenW135) y 16 (MenY). Las respuestas están principalmente en la subclase IgG1, que es la subclase predominantemente inducida en ratones por antígenos T-dependientes. Debido a que los polisacáridos son inherentemente antígenos T-independientes que no son capaces de inducir memoria inmunológica, estos datos muestran que la conjugación había tenido el efecto deseado.

Los sueros Post-II también se ensayaron para determinar la actividad bactericida usando un ensayo *in vitro* para medir la lisis de bacterias mediada por complemento.

Los sueros Post-II se inactivaron durante 30 minutos a 56°C antes de uso en el ensayo, y se usó 25% de complemento de conejo infantil como fuente de complemento. Se expresó la titulación bactericida como la dilución de suero recíproca que produce 50% de muerte de bacteria 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 incluyeron:

| Vehículo | Polí/oligo sacárido | Aprox. αDP | 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 | - |
| 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 sin selección por 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 sin selección por tamaño | 10 | - | 615 | - |
| CRM ₁₉₇ | O | 15 | fosfato | 1515 | - |
| CRM ₁₉₇ | O | 15 | fosfato | 876 | - |
| CRM ₁₉₇ | O | 15 | fosfato | 1232 | - |

ES 2 347 458 T3

| Vehículo | Poli/oligo sacárido | Aprox. αDP | Adyuvante de aluminio | GMT | Actividad bactericida |
|--------------------|---------------------|------------|-----------------------|------|--|
| CRM ₁₉₇ | ○ | 15 | fosfato | 852 | - |
| CRM ₁₉₇ | ○ | 15 | fosfato | 863 | F8238: 2048; A1: 2048; F6124: >2048 |
| CRM ₁₉₇ | ○ | 27 | fosfato | 1733 | F8238: 4096-8192; F6124: 4096-8192 |
| CRM ₁₉₇ | ○ | 15 | fosfato | 172 | F8238: 1024; A1: 1024-2048; F6124: 2048 |
| CRM ₁₉₇ | ○ | 15 | hidróxido | 619 | F8238: 1024; A1: 2048; F6124: 2048 |

Los resultados para MenW135 incluyeron:

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

ES 2 347 458 T3

Los resultados para MenY incluyeron:

| Vehículo | Poli/oligo sacárido | αDP | 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 |
| CRM ₁₉₇ | 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 de MenA en combinación con conjugado de MenC*

Granel concentrado de CRM-MenC (de Chiron Vaccines, Italia) se mezcló con granel concentrado de CRM-MenA (obtenido como se ha descrito anteriormente) se diluyeron y se mezclaron mediante agitación. Se realizaron tres diferentes preparaciones. Cada una contenía 20 µg de sacárido/ml para MenA, excepto que se incluyeron diferentes cantidades de conjugado de MenC: (i) 20 µg de sacárido/ml (ii) 10 µg de sacárido/ml; (iii) 5 µg de sacárido/ml. Las relaciones de MenA:MenC (*p/p*) fueron así: (i) 1:1; (ii) 2:1; (iii) 4:1.

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

Se preparó un segundo conjunto de vacunas de la misma manera, excepto que la adición de fosfato de aluminio se reemplazó con el mismo volumen de agua.

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

Anticuerpos anti-polisacárido para MenA y MenC se determinaron como se ha descrito anteriormente.

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

La titulación específica de anti-MenApS obtenida con el control de conjugado MenA era mayor (con o sin adyuvante de alumbre) que para la combinación de MenA+MenC a la misma dosificación (Figura 5a). Cuando se usa una cantidad menor de conjugado de MenC en la combinación, se indujo un mejor título de anti-MenApS mediante el componente de conjugado de MenA. Al mismo tiempo, el título de anti-MenC permanece aceptable (Figura 5b).

También se realizaron experimentos usando un modelo de cobaya. Se realizaron tres preparaciones diferentes, usando el mismo adyuvante de fosfato de aluminio como antes (hidroxifosfato amorfo, relación molar de PO₄/Al entre 0,84 y 0,92, 0,6 mg de Al³⁺/ml):

ES 2 347 458 T3

| Preparación | Men A * | Men C * | Relación MenA : Men C |
|---------------------------|----------|----------|-----------------------|
| A | 20 µg/ml | 20 µg/ml | 1 : 1 |
| B | 40 µg/ml | 20 µg/ml | 2 : 1 |
| C | 20 µg/ml | 10 µg/ml | 1 : 1/2 |
| * Expresado como sacárido | | | |

Estas preparaciones se diluyeron 1:2 con solución salina y se usaron para inmunizar cobayas. Cinco cobayas (cepa Hartelley, hembras, 450-500 gramos) para cada grupo de inmunización se inyectaron s.c. dos veces con 0,5 ml de vacuna los días 0 y 28. Se tomaron muestras de sangre antes de la primera inmunización y después el día 42. Se almacenó el suero a -70°C antes del análisis mediante ELISA y ensayo bactericida de 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 grupos serológicos C, W135 e Y

Conjugados de polisacáridos de los grupos serológicos C, W135 e Y se mezclaron como se ha descrito anteriormente proporcionando una concentración final de 20 µg de sacárido/ml para cada conjugado. La vacuna contenía una concentración final de 5 mM de fosfato de sodio y 9 mg/ml de NaCl, pH 7,2. Después de almacenamiento durante toda una noche, la mezcla se diluyó hasta que contuviera 4 µg de sacárido/ml para cada conjugado para inmunización.

Las inmunizaciones y análisis se realizaron como antes.

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

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

Conjugados de polisacáridos de los grupos serológicos A, C, W135 e Y se mezclaron como se ha descrito anteriormente proporcionando una concentración final de 20 µg de sacárido/ml para los conjugados de grupo serológico A, W135 e Y y 5 µg de sacárido/ml para el conjugado del grupo serológico C. La vacuna contenía una concentración final de 5 mM fosfato de sodio, 9 mg/ml NaCl, fosfato de aluminio (proporcionando una concentración de Al³⁺ de 0,6 mg/ml), pH 7,2. Después la mezcla se mantuvo, sin agitación, a 2-8°C durante toda una noche y después se diluyó con solución salina proporcionando 4 µg de sacárido/ml para los conjugados A, W135 e Y y 1 µg de sacárido/ml para el conjugado C. Esta mezcla diluida se usó para inmunización.

Las inmunizaciones y análisis se realizaron como antes, incluyendo los controles conjugados individuales excepto para el grupo serológico C.

La Figura 9 muestra que, como antes, la inmunogenicidad del conjugado MenW135 se potenció cuando se administraba en combinación con los conjugados MenA, MenC y MenY.

La Figura 10 muestra que la inmunogenicidad del conjugado MenY no es diferente significativamente cuando se administra en combinación con los conjugados MenA, MenC y MenW135.

La Figura 11 muestra que la inmunogenicidad del conjugado MenA disminuye de manera notable en la combinación, incluso cuando el conjugado MenC se administra a una dosis inferior (1:4). Esta competición antigénica no se observa en la vacuna tetravalente de polisacárido no - conjugada d (ACWY) [5].

I. Antígeno del grupo serológico A liofilizado

El polisacárido capsular del grupo serológico A *N.meningitidis* es particularmente susceptible a hidrólisis. Conjugados de oligosacárido capsular MenA se prepararon después en forma liofilizada, listo para la reconstitución en el momento de la administración. La forma liofilizada se preparó para que tuviera componentes que proporcionaran la siguiente composición después de la reconstitución en una dosis unitaria:

| Componente | Concentración |
|---------------------------|----------------------|
| CRM-MenA | 20 µg de sacárido/ml |
| Tampón fosfato de potasio | 5 mM |
| Manitol | 15 mg/ml |

ES 2 347 458 T3

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

| Componente | Concentración | Concentración |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Hidróxido de aluminio | 0,68 mg Al ³⁺ /ml | - |
| Fosfato de aluminio* | - | 0,6 mg Al ³⁺ /ml |
| Tampón Fosfato de sodio | - | 10 mM |
| Tampón Histidina | 10 mM | - |
| Cloruro de sodio | 9 mg/ml | 9 mg/ml |
| Tween 80 | 0,005% | 0,005% |
| PH | 7.2 ± 0.05 | 7,2 ± 0,05 |

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

Cuando se reconstituye con agua para inyección, la estabilidad del componente sacárido era como sigue:

| 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 |

En la misma escala de tiempo de 4 semanas, pH era estable a 7,2 tanto a 2-8°C como a 36-38°C, el contenido de proteína era estable a aproximadamente 24,5 µg/ml, y el contenido en humedad estaba por debajo de 2,5%.

Cuando se reconstituyó con la solución de adyuvante de fosfato de aluminio y se almacenó a 2-8°C, la estabilidad era como sigue:

| Tiempo (días) | Almacenado a 2 - 8 °C | | |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------|
| | 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 |

ES 2 347 458 T3

J. Vacuna de combinación para los grupos serológicos A, C, W135 e Y (conjugado del grupo serológico A liofilizado)

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

| Componente | Concentración | Concentración |
|--|------------------------------|-----------------------------|
| Hidróxido de aluminio | 0,68 mg Al ³⁺ /ml | - |
| Fosfato de aluminio * | - | 0,6 mg Al ³⁺ /ml |
| CRM-MenC | 20µg de sacárido/ml | 20µg de sacárido/ml |
| CRM-MenY | 20µg de sacárido/ml | 20µg de sacárido/ml |
| CRM-MenW135 | 20µg de sacárido/ml | 20µg de sacárido/ml |
| Tampón fosfato de sodio | - | 10 mM |
| Tampón histidina | 10 mM | * |
| Cloruro de sodio | 9 mg/ml | 9 mg/ml |
| Tween 80 | 0,005% | 0,005% |
| * hidroxifosfato amorfo, relación molar de PO ₄ /Al entre 0,84 y 0,92 | | |

Para la mezcla de hidróxido, la estabilidad de los componentes sacárido era como sigue:

| Tiempo (días) | Almacenado a 2 - 8°C | | Almacenado a 36 - 38°C | |
|-------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|
| | Sacárido libre (µg/ml) | Sacárido libre % | Sacárido libre (µg/ml) | Sacárido libre % |
| Granel de MenC | | | | |
| 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 |
| Granel de MenW135 | | | | |
| 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 | 20,0 | 10,2 | 3,3 | 16,3 |
| Granel de MenY | | | | |
| 0 | 1,7 | 8,3 | 1,7 | 8,3 |
| 15 | <1,3 | <6,3 | 2,0 | 10,2 |

ES 2 347 458 T3

| | | | | |
|----------------|-----|-----|-----|------|
| 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 |

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

Para la mezcla de hidróxido, la estabilidad de los componentes sacárido era como sigue:

| 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 % |
| Granel de MenC | | | | | | |
| 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 |
| Granel de MenW135 | | | | | | |
| 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 |
| Granel de MenY | | | | | | |
| 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 |

ES 2 347 458 T3

| | | | | | | |
|----------------|------|------|------|------|------|------|
| 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 |

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

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 mediante inyección subcutánea el día 0 y 28. La mezcla contenía 2 µg de cada conjugado de sacárido por dosis que representa 1/5 de la dosis individual humana (SHD). Los controles fueron solución salina o polisacáridos homólogos conjugados. Se tomaron muestras de sangre antes de la inmunización y después el día 42, con suero almacenado a -70°C. IgG se determinó como se ha descrito anteriormente.

Todos los conjugados usados eran seguros e inmunogénicos en animales. Títulos GMT post-II ELISA (con 95% de intervalos de confianza) eran como sigue:

| Vacuna | Adyuvante | A | Y | W135 | C |
|---|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| MenA (liofilizado o 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) |

Figura 17 muestra los resultados de análisis de la subclase de IgG para: (17A) MenA; (178) MenC; (17C) MenW135; y (170) MenY. IgG1 es claramente la subclase más prominente.

ES 2 347 458 T3

Las titulaciones bactericidas en suero fueron como sigue:

| Vacuna | Adyuvante | Anti-MenA | | | Anti-MenY | | Anti-MenW135 | | Anti-MenC |
|---|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|
| | | F8238 | A1 | F6124 | 242975 | 240539 | 5554 | 242317 | C11 |
| MenA (liofilizado) | 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 (liofilizado) + 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 |

ES 2 347 458 T3

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

Se inmunizaron ratones como se ha descrito anteriormente, excepto que las composiciones de vacuna contenían diferentes relaciones de los diversos conjugados de oligosacáridos. Las dosis eran de manera diversa 0,5, 1, 2 ó 4 $\mu\text{g/dosis}$. Se usó MenA oligo-conjugado liofilizado en todos los experimentos.

Las titulaciones ELISA eran como sigue:

| | Cantidad de antígeno ($\mu\text{g/dosis}$) | | | | Adyuvante de aluminio | GMT ELISA (95% de intervalo de confianza) | | | |
|----|--|---|------|-----|-----------------------|---|---------------------|--------------------|---------------------|
| | A | C | W135 | Y | | A | C | W135 | Y |
| 10 | | | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | | | |
| | 4 | 2 | 2 | 2 | Fosfato | 177 (107 - 291) | 367 (263 - 510) | 239 (135 - 424) | 239 (184 - 311) |
| 20 | | | | | | | | | |
| | 4 | 2 | 2 | 2 | Hidróxido | 390 (313 - 486) | 494 (345 - 706) | 338 (266 - 430) | 158 (96 - 260) |
| 25 | | | | | | | | | |
| | 2 | 2 | 2 | 2 | Fosfato | 132 (59 - 296) | 582 (268 - 1155) | 143 (75 - 272) | 247 (152 - 400) |
| 30 | | | | | | | | | |
| | 2 | 2 | 2 | 2 | Hidróxido | 337 (239 - 476) | 569 (462 - 679) | 171 (117 - 251) | 100 (59 - 169) |
| 35 | | | | | | | | | |
| | 4 | 2 | 1 | 1 | Fosfato | 137 (47 - 397) | 192 (88 - 421) | 18 (4 - 75) | 315 (174 - 571) |
| 40 | | | | | | | | | |
| | 4 | 2 | 1 | 0,5 | Fosfato | 152 (82 - 271) | 207 (100 - 428) | 51 (21 - 125) | 220 (125 - 388) |
| 45 | | | | | | | | | |
| | 4 | 2 | 1 | 2 | Fosfato | 113 (49 - 263) | 230 (98 - 540) | 23 (6 - 91) | 267 (81 - 877) |
| 50 | | | | | | | | | |
| | 4 | 2 | 0,5 | 1 | Fosfato | 267 | 504 | 46 | 583 |
| 55 | | | | | | | | | |
| 60 | | | | | | | | | |
| 65 | | | | | | | | | |

ES 2 347 458 T3

| | | | | | | | | | |
|----|---|---|-----|-----|--------------|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| | | | | | (109 - 656) | (300 - 847) | (15 - 134) | (330 - 1030) | |
| 5 | 4 | 2 | 2 | 1 | Fosfato | 87 (49 - 155) | 118 (51 - 278) | 24 (8 - 72) | 214 (140 - 326) |
| 10 | 2 | 2 | 1 | 1 | Fosfato | 217 (132 - 355) | 514 (332 - 796) | 110 (66 - 183) | 206 (141 - 300) |
| 15 | 2 | 2 | 1 | 0,5 | Fosfato | 105 (40 - 279) | 381 (180 - 808) | 90 (34 - 236) | 206 (96 - 445) |
| 20 | 2 | 2 | 1 | 2 | Fosfato | 155 (71 - 339) | 374 (196 - 713) | 53 (28 - 100) | 502 (335 - 752) |
| 25 | 2 | 2 | 0,5 | 1 | Fosfato | 224 (125 - 400) | 358 (223 - 577) | 43 (14 - 128) | 624 (426 - 914) |
| 30 | 2 | 2 | 2 | 1 | Fosfato | 180 (113 - 288) | 306 (190 - 492) | 70 (34 - 146) | 423 (258 - 696) |
| 35 | | | | | | | | | |

Las titulaciones bactericidas en suero fueron como sigue:

| Cantidad de antígeno (µg/dosis) | | | | Adyuvante de aluminio | Titulación 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 |

ES 2 347 458 T3

| Cantidad de antígeno ($\mu\text{g}/\text{dosis}$) | | | | Adyuvante de aluminio | Titulación de anticuerpo bactericida | | | |
|---|---|------|-----|-----------------------|--------------------------------------|-----------|---------|------------|
| A | C | W135 | Y | | A | C | W135 | Y |
| 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 |

Se realizó un segundo conjunto de experimentos usando una dosificación de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sacárido para MenA y MenC, la mitad de la dosificación para MenY, y un cuarto de dosificación para MenW135. Las titulaciones de ELISA fueron como sigue:

| Cantidad de antígeno ($\mu\text{g}/\text{dosis}$) | | | | Adyuvante de aluminio | GMT ELISA (95% de intervalo de confianza) | | | |
|---|---|------|-----|-----------------------|---|------------------|-----------------|------------------|
| 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) |

ES 2 347 458 T3

L. Oligosacáridos MenA, W135 e Y conjugados

La tabla siguiente muestra datos relativos a conjugados MenA, MenW135 y MenY apropiados para realizar combinación de composiciones de la invención:

5

10

15

20

| | A | W135 | Y |
|------------------------------|------|------|------|
| GP tras selección por 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% |

Referencias

25

[1] **Frash** (1990). *Advances in Biotechnological Processes* (eds. Mizrahi & Van Wezel) 13: 123-145.

[2] **Armand et al.** (1982). *J. Biol. Stand.* 10: 335-339.

30

[3] **Cadoz et al.** (1985). *Vaccine* 3:340-342.

[4] *MMWR* (1997) 46 (RR-5) 1-10.

[5] **Baklaic et al.** (1983). *Infect. Immun.* 42: 599-604.

35

[6] **Costantino et al.** (1992). *Vaccine* 10: 691-698

[7] WO02/00249.

40

[8] **Inzana** (1987). *Infect. Immun.* 55: 1573-1579.

[9] WO98/32873

[10] Patente EE.UU. 4.753.796.

45

[11] Patente europea 0072513.

[12] Solicitud de patente Reino Unido 0207117.3

50

[13] **Pon et al.** (1997). *J. Exp. Med.* 185: 1929-1938.

[14] **Ravenscroft et al.** (1999). *Vaccine* 17: 2802-2816.

[15] **Ramsay et al.** (2001). *Lancet* 357 (9251): 195-196.

55

[16] **Lindberg** (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.

[17] **Buttery & Moxon** (2000). *J. R. Coll. Physicians Lond.* 34: 163-168.

60

[18] **Ahmad & Chapnick** (1999). *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 13: 113-133, vii.

[19] **Goldblatt** (1988). *J. Med. Microbiol.* 47: 563-567.

[20] Patente europea 0477508.

65

[21] Patente EE.UU. 5.306.492.

[22] WO98/42721.

ES 2 347 458 T3

- [23] **Dick et al.** (1989). *Conjugado Vaccines* (eds. Cruse et al.) Karger, Basel 10: 48-114.
- [24] **Hermanson** (1996). *Bioconjugado Techniques*, *Academic Press*, San Diego ISBB: 0123423368
- 5 [25] Anónimo (Enero 2002). *Research Disclosure*, 453077.
- [26] **Anderson** (1983). *Infect. Immun.* 39 (1): 233-238.
- [27] **Anderson et al.** (1985). *J. Clin. Invest.* 76 (1): 52-59.
- 10 [28] EP-A-0372501.
- [29] EP-A-0378881.
- 15 [30] EP-A-0427347.
- [31] WO93/17712.
- [32] WO94/03208
- 20 [33] WO98/58668.
- [34] EP-A-0471177.
- 25 [35] WO91/01146.
- [36] **Falugi et al.** (2001). *Eur. J. Immunol.* 31:3816-3824.
- [37] WO00/56360.
- 30 [38] WO00/61761.
- [39] WO99/42130.
- 35 [40] WO96/40242.
- [41] **Lees et al.** (1996). *Vaccine* 14: 190-198.
- [42] WO95/08348.
- 40 [43] Patente EE.UU. 4.882.317.
- [44] Patente EE.UU. 4.695.624.
- 45 [45] *Mol. Immunol.* (1985). 22: 907-919.
- [46] EP-A-0208375.
- [47] WO00/10599.
- 50 [48] **Gever et al.** (1979). *Med. Microbiol. Immunol.* 165: 171-288.
- [49] Patente EE.UU. 4.057.685.
- 55 [50] Patente EE.UU. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [51] Patente EE.UU. 4.459.286.
- [52] Patente EE.UU. 4.965.338.
- 60 [53] Patente EE.UU. 4.663.160.
- [54] Patente EE.UU. 4.761.283.
- 65 [55] Patente EE.UU. 4.356.170.
- [56] **Lei et al.** (2000). *Dev. Biol.* (Basel) 103: 259-264.

ES 2 347 458 T3

- [57] WO00/38711.; Patente EE.UU. 6.146.902.
- [58] **McLeod** Griffiss *et al.* (1981) *Infect. Immun.* 34:725-732.
- 5 [59] WO99/24578.
- [60] WO99/36544.
- [61] WO99/57280.
- 10 [62] WO00/22430.
- [63] **Tettelin** *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.
- 15 [64] **Pizza** *et al.* (2000) *Science* 287:1816-1820.
- [65] WO01/52885.
- [66] **Bjune** *et al.* (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- 20 [67] **Fukasawa** *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- [68] **Rosenqvist** *et al.* (1998) *Oev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- 25 [69] WO96/14086.
- [70] **Covacci & Rappuoli** (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592.
- [71] WO93/18150.
- 30 [72] **Covacci** *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 5791-5795.
- [73] **Tummuru** *et al.* (1994) *Infect. Immun.* 61 :1799-1809.
- 35 [74] **Marchetti** *et al.* (1998) *Vaccine* 16:33-37.
- [75] **Telford** *et al.* (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.
- [76] **Evans** *et al.* (1995) *Gene* 153:123-127.
- 40 [77] WO96/01272 & WO96/01273, especially SEQ ID NO: 6.
- [78] WO97/25429.
- 45 [79] WO98/04702.
- [80] **Watson** (2000) *Pediatr Infect Ois J* 19:331-332.
- [81] **Rubin** (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- 50 [82] **Jedrzejjas** (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [83] **Bell** (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- 55 [84] **Iwarson** (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [85] **Gerlich** *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [86] WO93/24148.
- 60 [87] **Costantino** *et al.* (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [88] WO97/00697.
- 65 [89] **Hsu** *et al.* (1999) *Clin Liver Ois* 3:901-915.
- [90] WO02/02606.

ES 2 347 458 T3

- [91] **Kalman et al.** (1999) *Nature Genetics* 21 :385-389.
- [92] **Read et al.** (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- 5 [93] **Shirai et al.** (2000) *J. Infect. Ois.* 181 (Suppl 3):S524-S527.
- [94] WO99/271 05.
- [95] WO00/27994.
- 10 [96] WO00/37494.
- [97] WO99/28475.
- 15 [98] **Ross et al.** (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- [99] **Sutter et al.** (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [100] **Zimmerman & Spann** (1999) *Am Fam Physician* 59: 113-118, 125-126.
- 20 [101] **Dreesen** (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
- [102] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Ene. 16;47(1): 12, 19.
- 25 [103] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [104] **McMichael** (2000) *Vaccine* 19 Suppl1 :S1 01-1 07.
- [105] **Schuchat** (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
- 30 [106] WO02/34771.
- [107] **Dale** (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- 35 [108] **Ferretti et al.** (2001) *PNAS EE.UU.* 98: 4658-4663.
- [109] **Kuroda et al.** (2001) *Lancet* 357(9264): 1225-1240; see also pages 1218-1219.
- [110] **Anderson** (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S59-65.
- 40 [111] **Kahn** (2000) *Curr Opin Pediatr* 12:257-262.
- [112] **Crowe** (1995) *Vaccine* 13:415-421.
- 45 [113] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85-100.
- [114] **Demicheli et al.** (1998) *Vaccine* 16:880-884.
- [115] **Stepanov et al.** (1996) *J Biotechnol* 44: 155-160.
- 50 [116] **Wassilak & Orenstein**, Chapter 4 of *Vaccines* (eds. Plotkin & Mortimer), 1988.
- [117] **Gustafsson et al.** (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- 55 [118] **Rappuoli et al.** (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [119] WO97/28273.
- [120] **Lieberman et al.** (1996) *JAMA* 275:1499-1503.
- 60 [121] WO00/56365.
- [122] **Gennaro** (2000). Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20^a ed ISBN: 0683306472.
- 65 [123] *Vaccine Design...*(1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [124] WO90/14837.

ES 2 347 458 T3

[125] Patente EE.UU. 6.299.884.

[126] WO00/07621.

5 [127] WO99/44636.

[128] GB-2220221.

[129] EP-A-0689454.

10

[130] WO00/56358.

[131] EP-A-0835318.

15

[132] EP-A-0735898.

[133] EP-A-0761231.

[134] WO99/52549.

20

[135] WO01/21207.

[136] WO01/21152.

25

[137] WO00/62800.

[138] WO00/23105.

[139] WO99/11241.

30

[140] WO98/57659.

[141] Del **Giudice et al.** (1998). *Molecular Aspects of Medicine*, vol.19, number 1.

35

[142] WO99/27960.

[143] WO98/20734.

[144] Solicitud de Patente Reino Unido 0118249.2.

40

[145] WO01/30390.

[146] **Chen et al.** (1956). *Anal. Chem.* 28: 1756-1758.

45

[147] **Habeeb et al.** (1966). *Anal. Biochem.* 14: 328-336.

[148] **Miron & Wilchek** (1982). *Anal. Biochem.* 126: 433-435..

[149] **Svennerholm** (1957). *Biochem. Biophys. Acta* 24: 604-611.

50

[150] **Carlone et al.** (1992). *J. Clin. Microbiol.* 30:154-159.

55

60

65

ES 2 347 458 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un kit que comprende: (a) sacárido capsular conjugado de grupo serológico A de *N.meningitidis*, en forma liofilizada; y (b) sacárido(s) capsular(es) de uno o más grupos serológicos C, W135 e Y de *N.meningitidis*, en forma líquida.
2. El kit de la reivindicación 1, en el que uno o más de los sacáridos de (b) está conjugado a una proteína vehículo.
- 10 3. El kit de la reivindicación 2, en el que la proteína vehículo es el toxoide de difteria CRM₁₉₇.
4. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que el sacárido capsular del grupo serológico A de *N.meningitidis* está conjugado a una toxina o toxoide bacteriano.
- 15 5. El kit de la reivindicación 4, en el que la toxina o toxoide bacteriano es toxoide de difteria, toxoide de tétanos o el toxoide de difteria CRM₁₉₇.
6. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que la conjugación es mediante un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido seguido de la derivatización con un diéster adípico y reacción con la proteína vehículo.
- 20 7. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que el sacárido capsular conjugado del grupo serológico A de *N.meningitidis* tiene una relación sacárido:proteína (p/p) de entre 0,5:1 y 5:1.
- 25 8. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que uno o más de los sacáridos está adsorbido a un adyuvante de hidróxido de aluminio.
9. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente (b) comprende un adyuvante de sal de aluminio.
- 30 10. El kit de la reivindicación 9, en el que el componente (b) comprende un adyuvante de fosfato de aluminio.
11. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que uno o más de los sacáridos es un oligosacárido.
- 35 12. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que el sacárido del grupo serológico A tiene un grado medio de polimerización de entre 10 y 20.
13. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente (b) comprende un sacárido del grupo serológico W135.
- 40 14. El kit de la reivindicación 13, en el que el sacárido del grupo serológico W135 sacárido tiene un grado medio de polimerización de entre 15 y 25.
15. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente (b) comprende un sacárido del grupo serológico Y.
- 45 16. El kit de la reivindicación 15, en el que el sacárido del grupo serológico Y tiene un grado medio de polimerización de entre 15 y 25.
17. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente (b) comprende un sacárido del grupo serológico C.
- 50 18. El kit de la reivindicación 17, en el que el sacárido del grupo serológico C tiene entre 12 y 22 unidades de repetición.
- 55 19. El kit de la reivindicación 17 o reivindicación 18, en el que la relación (p/p) de sacárido del grupo serológico A al sacárido del grupo serológico C es mayor que 1.
20. El kit de la reivindicación 19, en el que la relación (p/p) de sacárido del grupo serológico A al grupo serológico C sacárido es 2:1.
- 60 21. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que los sacáridos de (b) están entre los grupos serológicos C, W135 e Y de *N.meningitidis*.
- 65 22. El kit de la reivindicación 21, en el que la relación (p/p) para los sacáridos de los grupos serológicos A:C:W135:Y es 2:1: 1:1.
23. El kit de cualquier reivindicación precedente, en la forma de dos viales.

ES 2 347 458 T3

24. El kit de cualquier reivindicación precedente, que comprende además un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B.

25. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que la dosis está entre 5 y 20 μg por sacárido por dosis.

26. Un procedimiento para preparar una vacuna que comprende sacáridos capsulares conjugados de al menos dos de los grupos serológicos A, C, W135 e Y de *N.meningitidis*, que comprende una etapa de mezclar (i) un conjugado liofilizado de sacárido capsular del grupo serológico A de *N.meningitidis* con (ii) conjugado(s) en forma líquida de capsular sacárido(s) capsular(es) de uno o más de los grupos serológicos C, W 135 e Y de *N.meningitidis*.

27. El procedimiento de la reivindicación 26, en el que los sacáridos de (ii) están entre los grupos serológicos C, W135 e Y de *N.meningitidis*.

28. El procedimiento de la reivindicación 27, en el que la relación (p/p) para los sacáridos de los grupos serológicos A:C:W135:Y es 2:1:1:1.

29. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que los sacáridos están conjugados al toxoide de difteria CRM₁₉₇.

30. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en el que la conjugación es mediante un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido seguido de la derivatización con un diéster adípico y reacción con la proteína vehículo.

31. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, en el que uno o más de los sacáridos es 7 son un oligosacárido.

32. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31, en el que uno o más de los sacáridos está adsorbido a un adyuvante de hidróxido de aluminio.

33. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, en el que la vacuna comprende un adyuvante de fosfato de aluminio.

34. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, en el que la vacuna comprende un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B, proteínas del grupo serológico B de *N.meningitidis* o preparaciones OMV.

35. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, en el que la dosis está entre 5 y 20 μg por sacárido por dosis.

FIGURA 1

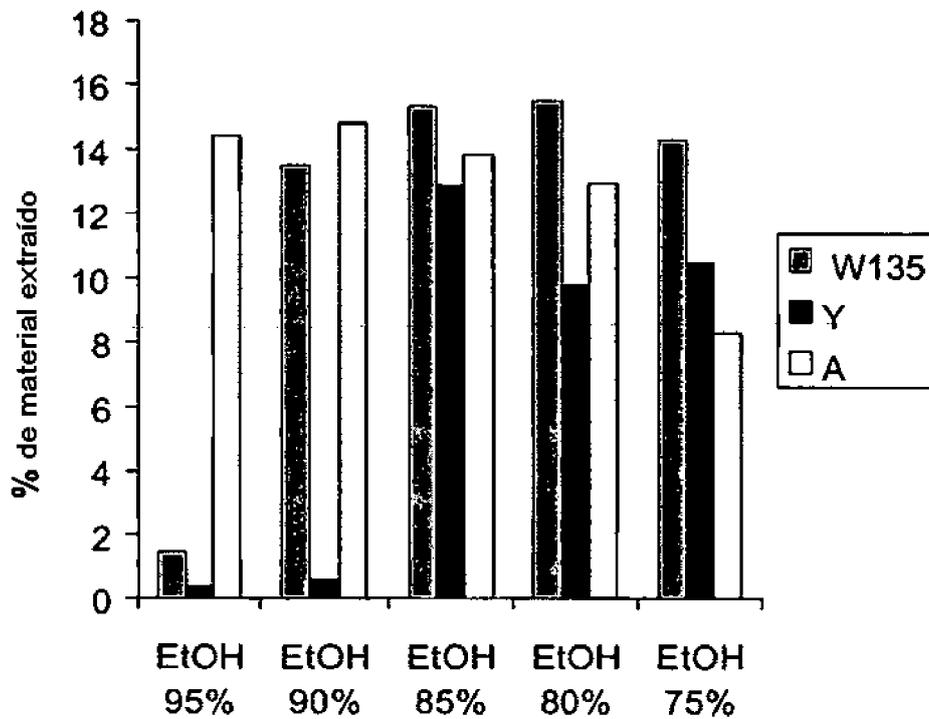


FIGURA 2

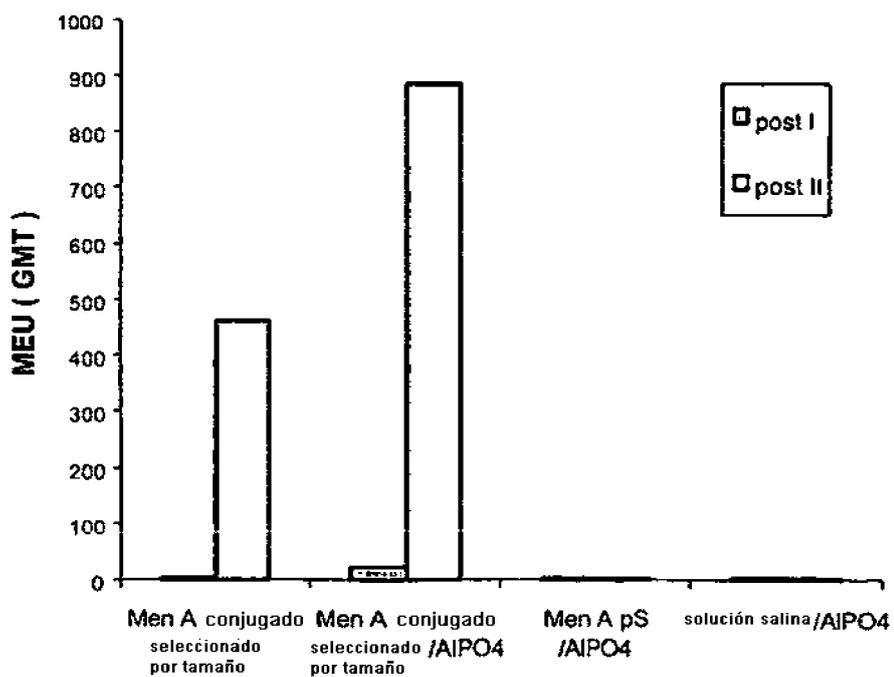


FIGURA 3

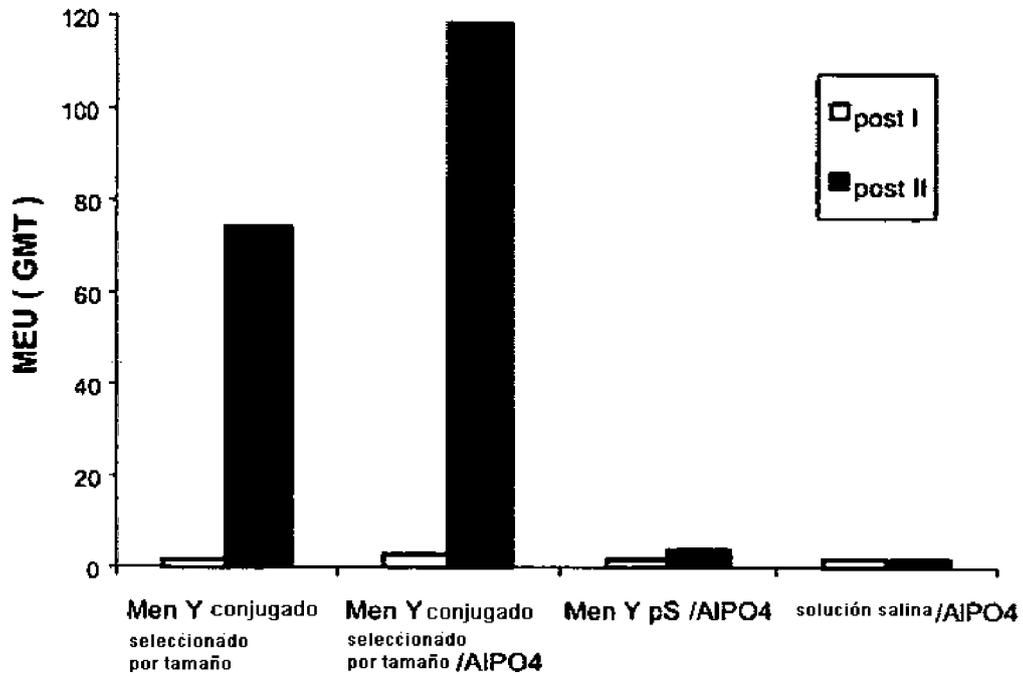


FIGURA 4

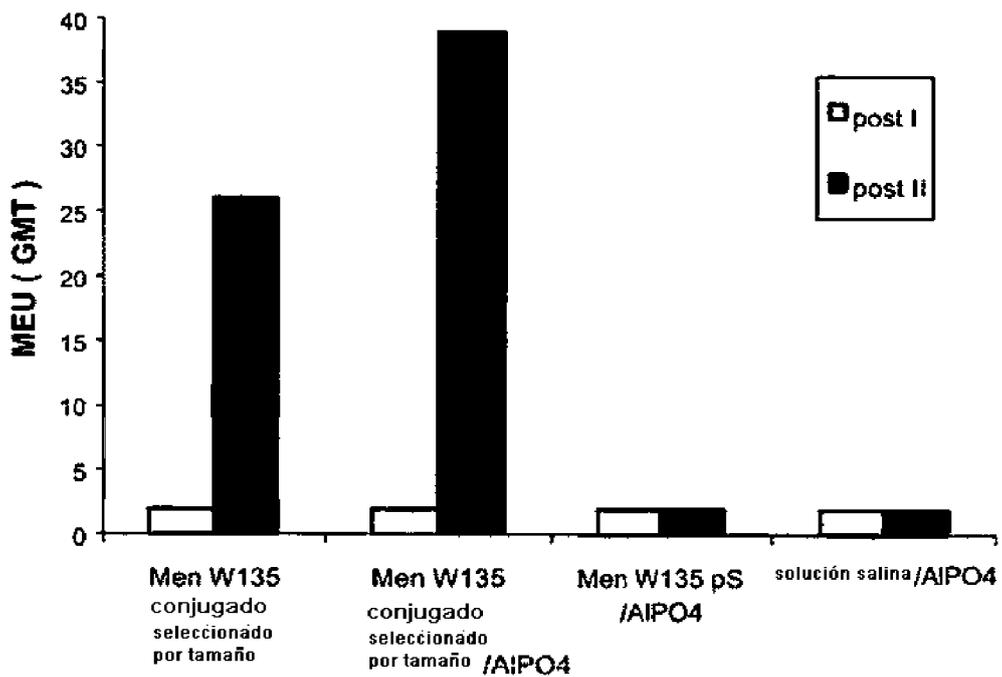


FIGURA 5a

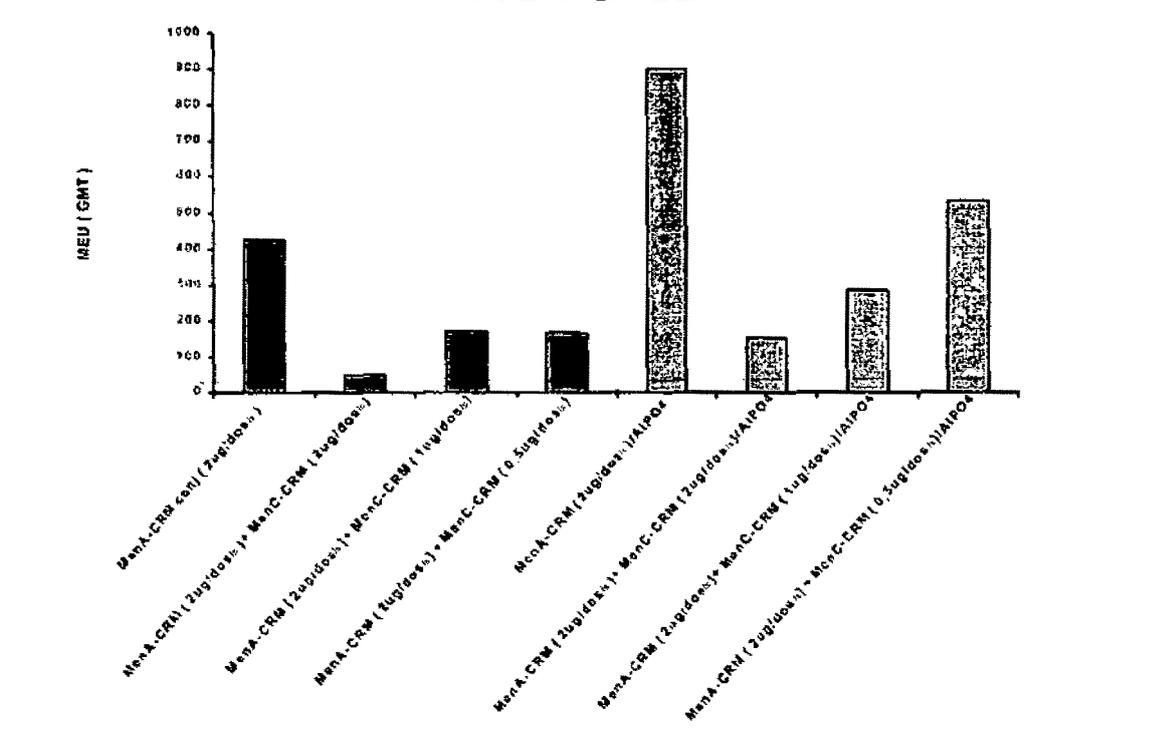


FIGURA 5b

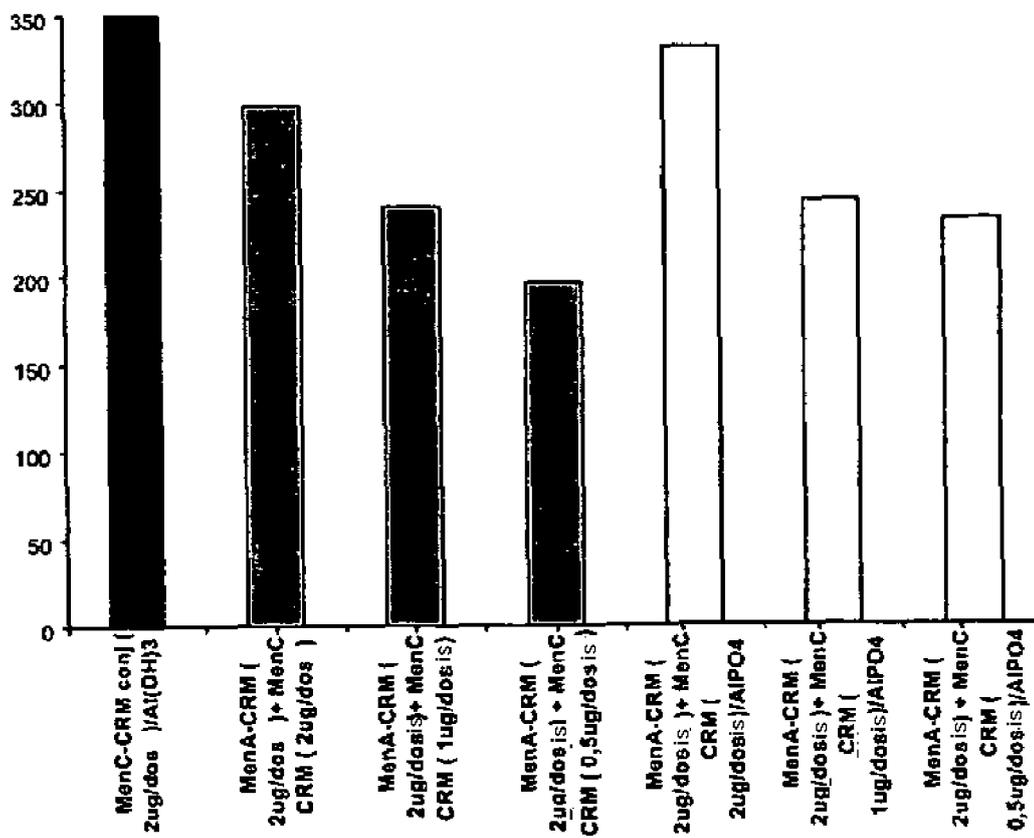


FIGURA 6

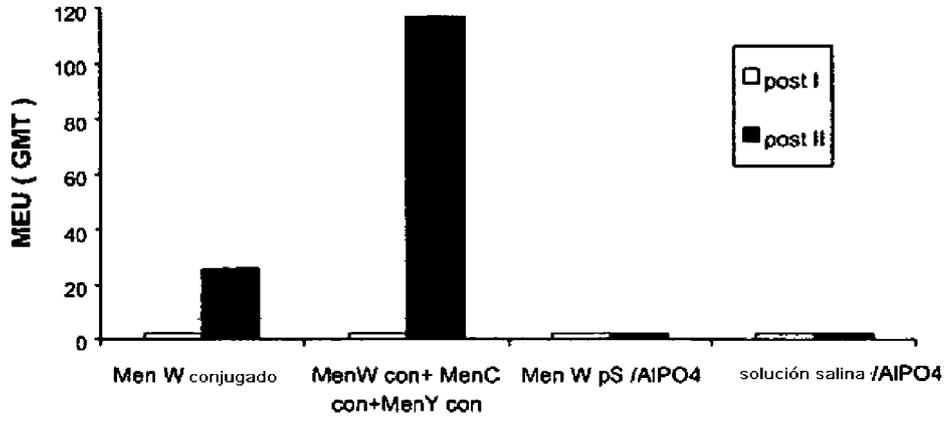


FIGURA 7

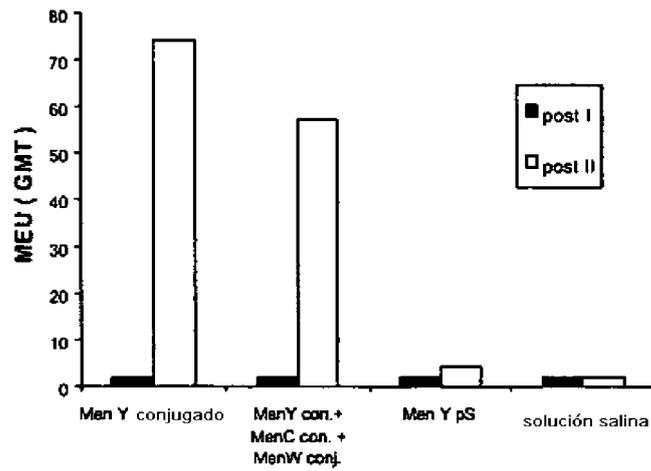


FIGURA 8

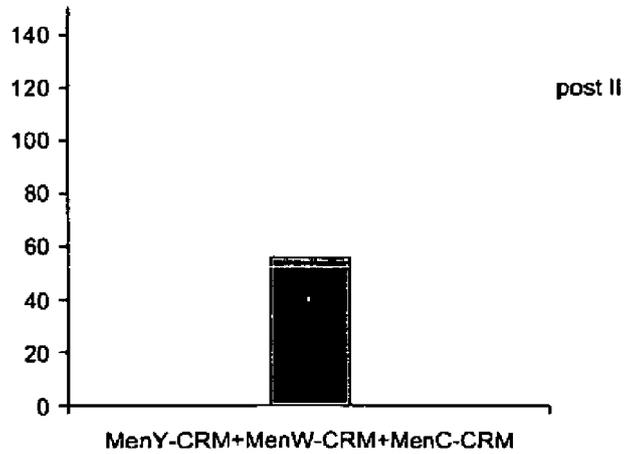


FIGURA 9

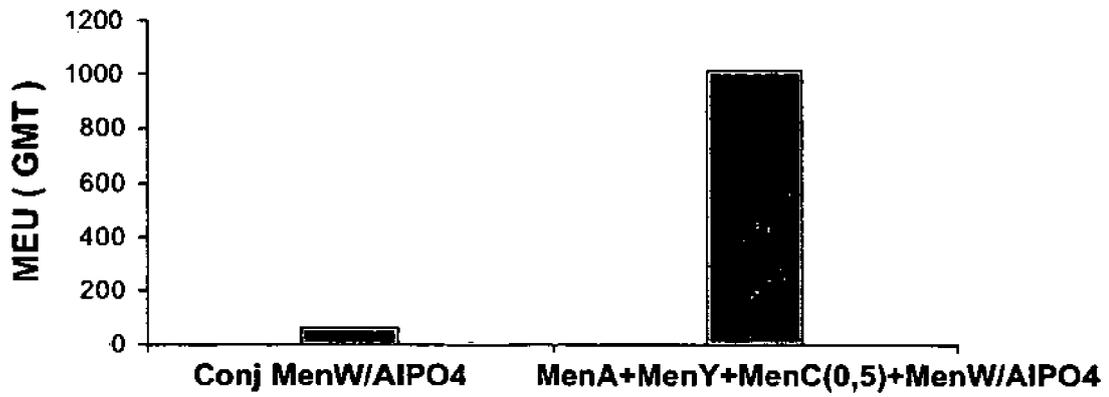


FIGURA 10

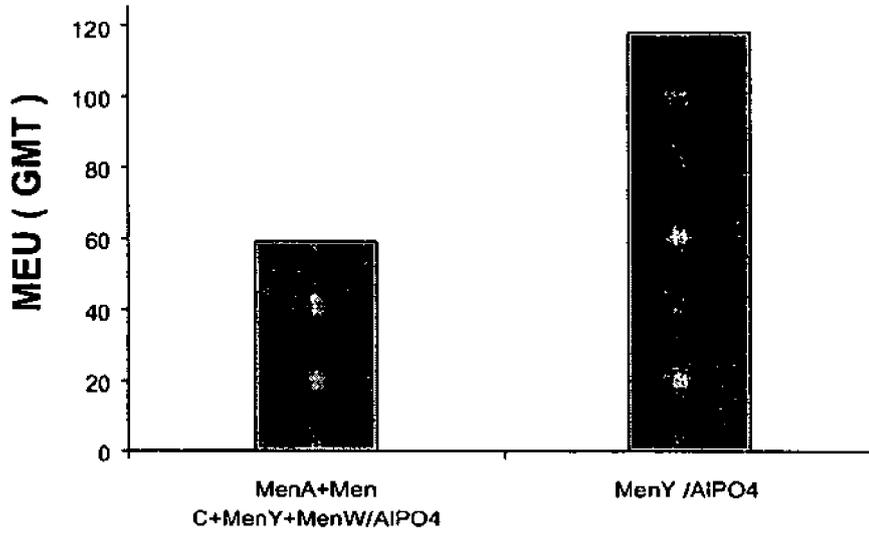


FIGURA 11



FIGURA 12

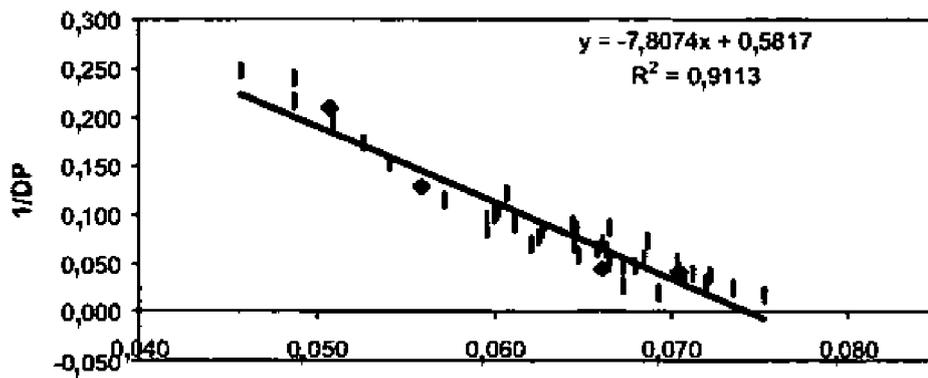


FIGURA 13

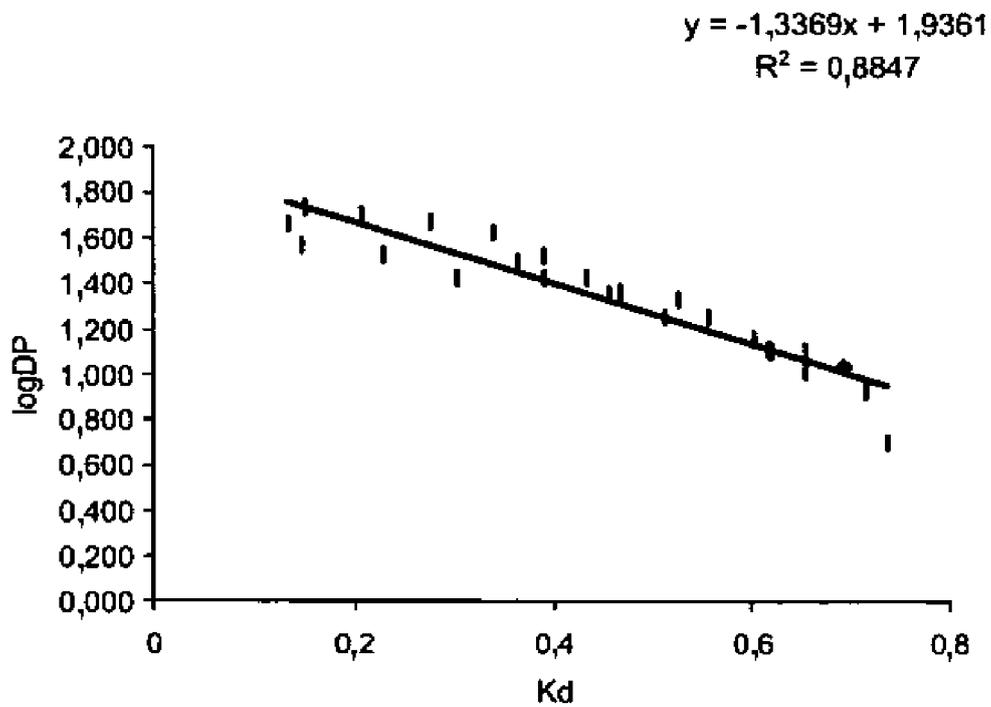


FIGURA 14

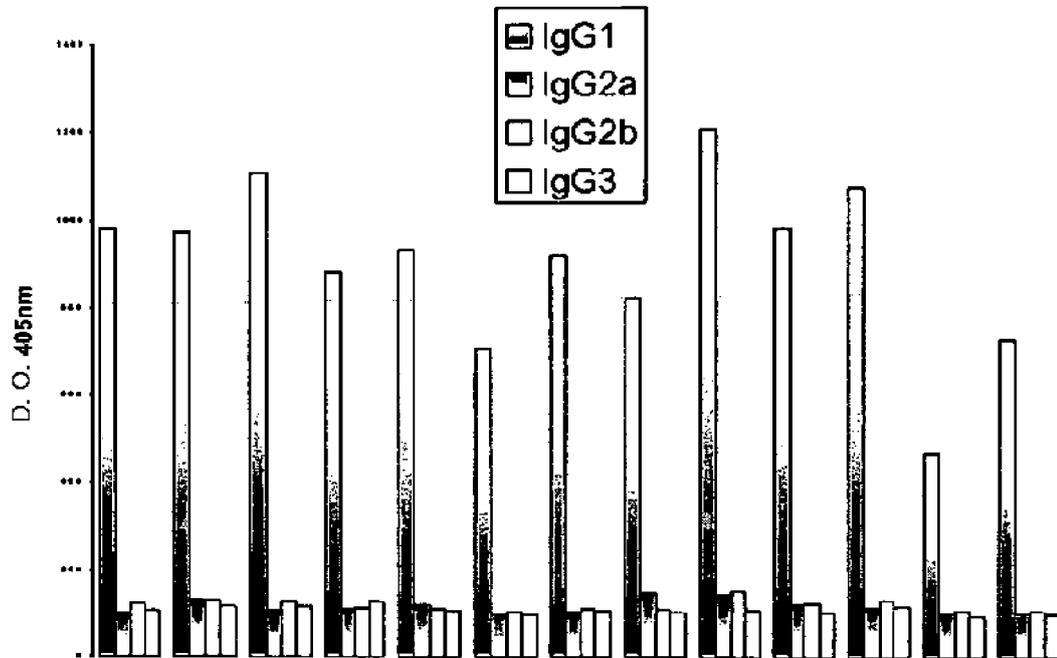


FIGURA 15

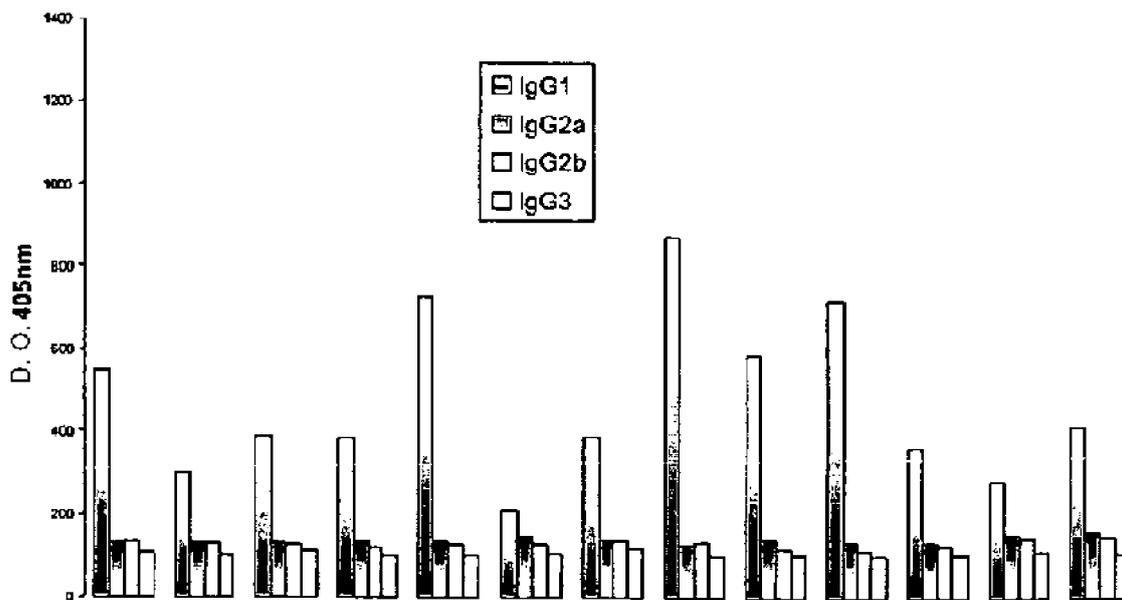


FIGURA 16

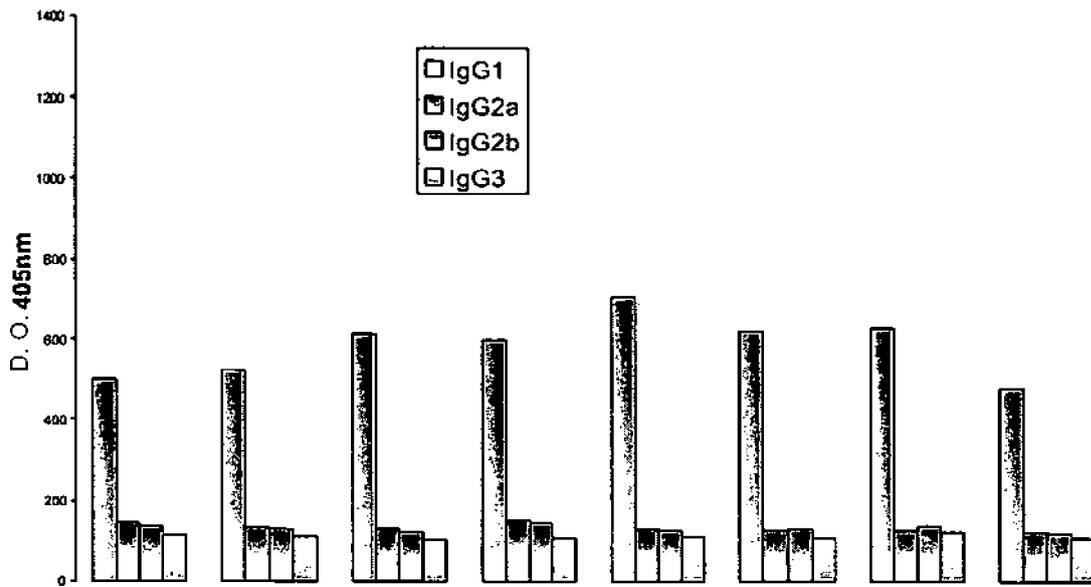


FIGURA 17



FIGURA 17A

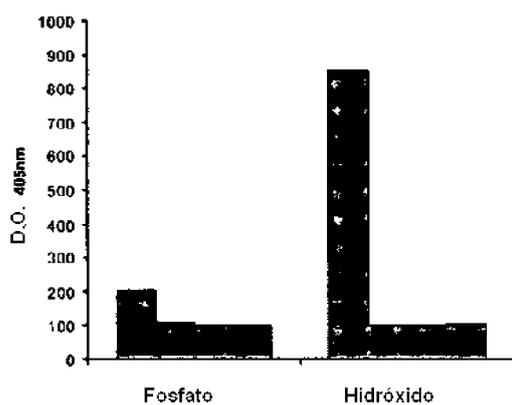


FIGURA 17B

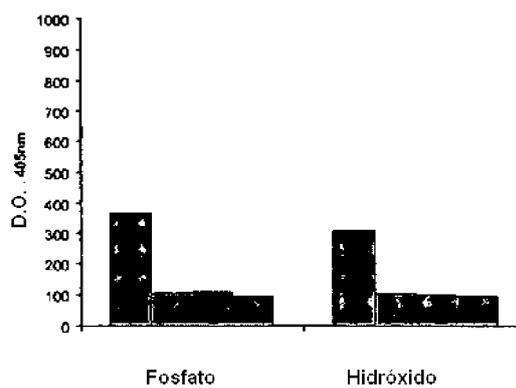


FIGURA 17C

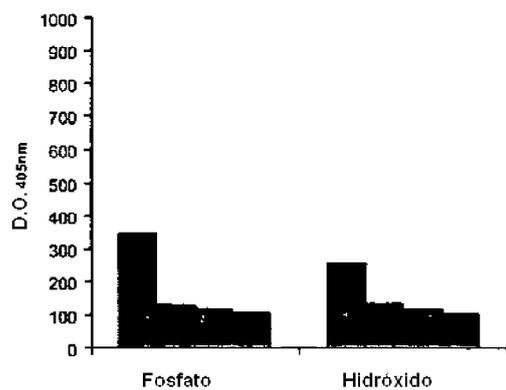


FIGURA 17D

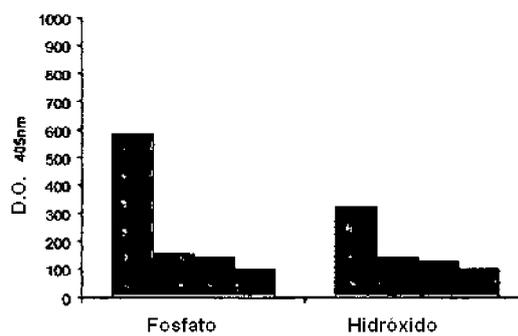


FIGURA 18

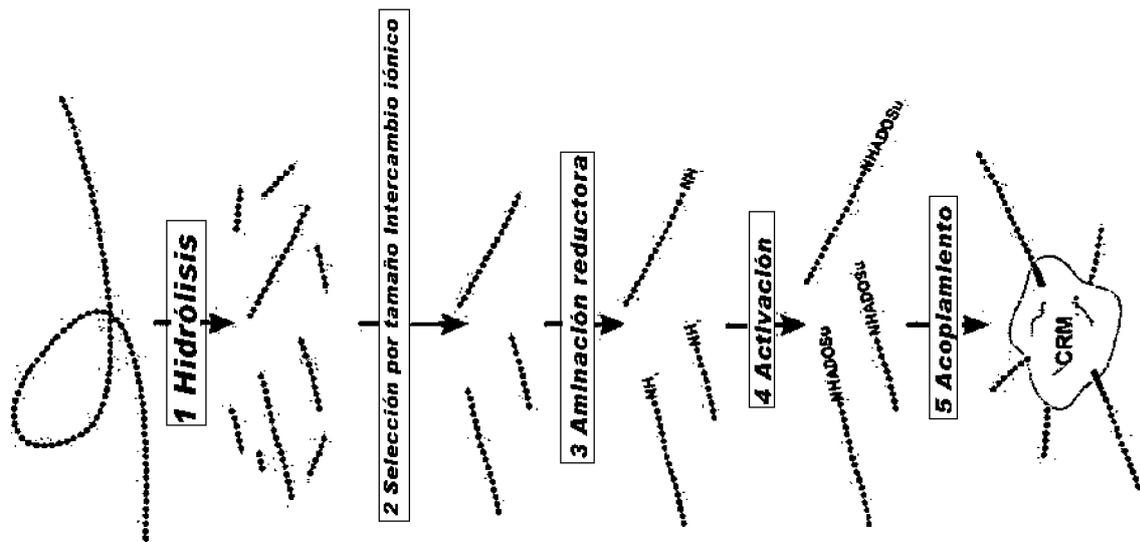


FIGURA 19A

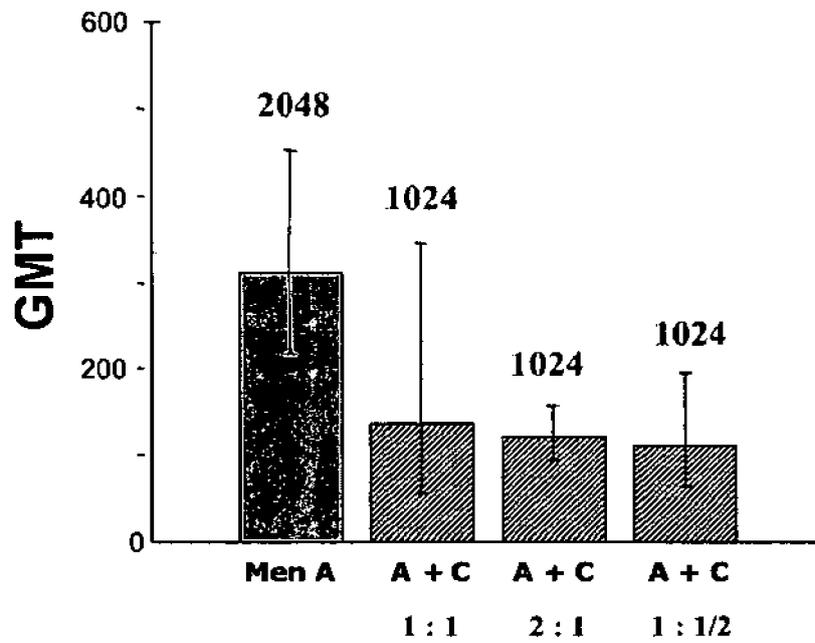


FIGURA 19B

