



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 962**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00203772 .9**

96 Fecha de presentación : **04.06.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **1090642**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2001**

54 Título: **Vacunas que comprenden un conjugado de antígeno polisacárido-proteína transportadora y una proteína transportadora libre.**

30 Prioridad: **07.06.1995 US 472639**
23.06.1995 GB 9512827
01.07.1995 GB 9513443
15.12.1995 GB 9525657

73 Titular/es: **GlaxoSmithKline Biologicals S.A.**
rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

72 Inventor/es: **Slaoui, Moncef Mohamed y**
Hauser, Pierre

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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 que comprenden un conjugado de antígeno polisacárido-proteína transportadora y una proteína transportadora libre.

La presente invención se refiere a vacunas de combinación que comprenden un antígeno polisacárido conjugado con a una proteína transportadora, y en las que la proteína transportadora está presente también como antígeno libre en la composición de la vacuna. En particular, la composición de la vacuna de la presente invención se refiere a una vacuna polivalente que es una vacuna destinada a la mejora o tratamiento de más de un estado patológico. La presente invención se refiere también a la producción y uso de dicha vacuna en medicina.

Las vacunas que utilizan polisacáridos se conocen en la técnica. Por ejemplo, una vacuna para la prevención de infecciones por *Haemophilus influenzae* b (Hib) se basa en el polisacárido capsular (PRP) conjugado con una proteína transportadora. La proteína transportadora es típicamente un toxoide diftérico o del tetánico. Se ha sugerido también producir una vacuna para la prevención de neumonía por *Streptococcus* que se basa en el polisacárido capsular conjugado con una proteína transportadora como por ejemplo toxoide tetánico o toxoide diftérico. Ejemplos de tales conjugados de antígeno para vacunas se describen en los documentos US 4 365 170, US 4 673 574, EP 208 375, EP 477 508 y EP 161 188.

Es conveniente administrar dichas vacunas de conjugado con otros antígenos o vacunas al mismo tiempo y esto puede requerir múltiples inyecciones. Los problemas asociados a múltiples inyecciones incluyen un procedimiento de administración más complicado y un gran volumen de inyección total. Éste es un problema particularmente grave cuando la vacuna se destina a los lactantes.

Se ha propuesto por lo tanto producir vacunas de combinación. Una vacuna de combinación bien conocida proporciona protección contra infecciones por *Diphtheria*, *Tetanus* y *B. pertusis*. Esta vacuna comprende un componente de *pertussis* (célula completa muerta de *B. pertusis* o *pertusis* acelular que consta típicamente de hasta tres antígenos - PT, FHA y 69 kDa) y una toxina de tipo toxoide diftérico y tetánico. A menudo se hace referencia a dichas vacunas como DTPc (célula completa) o DTPa (acelular).

Sería conveniente añadir vacunas a base de conjugado de polisacárido a dicha combinación. Sin embargo, se ha encontrado que una simple mezcla de los componentes da lugar a una reducción de los títulos de anticuerpos al componente polisacárido y que la persistencia de los niveles protectores de dichos títulos de anticuerpos se reduce. De esta forma, la capacidad inmunogénica del polisacárido de Hib PRP conjugado hacia el toxoide tetánico destoxificado (TT) se ha observado que disminuye en lactantes inmunizados con conjugado TT-PRP combinado con DTPa cuando se compara con lactantes inmunizados con conjugado TT-PRP combinado con DTPa de forma concomitante pero en sitios separados.

En la situación monovalente, es decir, cuando una vacuna comprende simplemente un único polisacárido (PS) conjugado con una proteína transportadora, cuanto más alto es el contenido proteico del conjugado mayor es la respuesta de anticuerpos frente al polisacárido. Se piensa que esto es debido a que la inducción de una respuesta específica de anticuerpos frente al polisacárido dependiente de células T requiere el acoplamiento covalente de un transportador proteico al polisacárido. El transportador proteico necesita estar presente en unas concentraciones (es decir relación PS a proteína) tales que se induzca una buena respuesta de células TH frente al transportador, y que esta respuesta de células TH pueda reconocer pueda reconocer clones de células B específicos de PS que expresen péptidos derivados de la proteína transportadora acoplada covalentemente.

Las vacunas monovalentes de la técnica anterior tienen típicamente una relación de polisacárido:proteína transportadora de 1:3 (peso:peso).

Sorprendentemente y en clara contraposición con la posición en la vacuna monovalente, los presentes inventores han descubierto que cuando el componente polisacárido del conjugado forma parte de una vacuna polivalente que comprende una forma libre de la proteína transportadora, la capacidad inmunogénica del componente polisacárido se proporciona reduciendo el contenido proteico del antígeno del conjugado.

Según esto, la presente invención proporciona una vacuna combinada de la reivindicación 1. Una relación preferida es 1:0,5 a 1:1,5, típicamente del orden de 1:1.

El conjugado de polisacárido puede prepararse mediante cualquier técnica conocida de acoplamiento. Por ejemplo el polisacárido puede acoplarse a través de una unión tioéter. Este procedimiento de conjugación confía en la activación del polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) para formar un éster de tipo cianato. El polisacárido activado puede de esta forma acoplarse directamente o a través de un grupo espaciador a un grupo amino en la proteína transportadora. Preferiblemente el éster cianato se copla con hexanodiamina y el polisacárido derivatizado en amino se conjuga con la proteína transportadora usando química de heteroligado que requiere la formación de la unión tioéter. Tales conjugados se describen en la solicitud publicada del PCT WO93/15760 de la Uniformed Services University.

ES 2 308 962 T3

Los conjugados pueden prepararse también por procedimientos de aminación reductiva directa tal y como se describe en los documentos US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). Otros procedimientos se describen en los documentos EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508.

- 5 Un procedimiento adicional requiere el acoplamiento de un polisacárido activado con bromuro de cianógeno derivatizado con hidrazida de ácido adípico (ADH) al transportador proteico mediante condensación con carbodiimida (Chu C. y cols., Infect. Immunity, 1983245 256).

- 10 La proteína transportadora es preferiblemente un antígeno de *Tetanus* o *Diphtheria*, preferiblemente toxoide tetánico o toxoide diftérico. El toxoide puede derivar también de *Bordetella*. El antígeno es típicamente un derivado no tóxico de una toxina de *Tetanus* o *Diphtheria*.

Las composiciones de la invención contienen preferiblemente un adyuvante adecuado.

- 15 Un adyuvante preferido es MPL (monofosforil lípido A 3-desacilado, conocido también como 3D-MPL). El 3D-MPL se conoce a partir del documento GB 2 220 211 (Ribi) como una mezcla de monofosforil lípido A 3-O-desacilado con cadenas aciladas en 4, 5 ó 6 y es fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Una forma preferida de MPL se describe en la solicitud de patente internacional 92/116556.

- 20 Otro adyuvante que puede usarse en la presente invención se conoce como QS21. QS21 es una fracción no tóxica purificada por HPLC de una saponina procedente de la corteza del árbol de América del Sur *Quillaja saponaria* molina, y el procedimiento de su producción se describe (como QS21) en la patente de los EE.UU. nº 5.057.540.

- 25 Se sabe que combinaciones de QS21 y 3D-MPL producen una formulación de vacuna sinérgicamente eficaz y se describen en la solicitud de patente internacional WO 94/00153.

- En algunos casos puede ser que la totalidad de la vacuna de la presente invención se presente en una emulsión de aceite en agua u otro vehículo adecuado, como por ejemplo liposomas, microesferas o partículas de antígeno encapsuladas.

- 30 Las formulaciones de vacuna pueden contener antígenos adicionales. El antígeno o composiciones antigénicas conocidos en la técnica pueden usarse en las composiciones de la invención, incluyendo antígeno o composiciones antigénicas derivadas de VIH-1 (como por ejemplo gp 120 o gp 160), virus de herpes humano o animal, como por ejemplo gD o derivados del mismo o proteína inmediata temprana como por ejemplo ICP27 procedente de HSV1 o HSV2, citomegalovirus (especialmente humano) (como por ejemplo gB o derivados del mismo), virus *Varicella Zoster* (como por ejemplo gpI, II ó III), o de un virus de hepatitis como por ejemplo el virus de hepatitis B, por ejemplo antígeno de superficie de hepatitis B o un derivado del mismo, virus de hepatitis A, virus de hepatitis C y virus de hepatitis E, o de otros patógenos víricos, como por ejemplo el virus respiratorio sincitial, virus del papiloma humano o virus de la gripe, o virus de la polio como por ejemplo el virus inactivado de la poliomielitis (IPV, Inactivated Polio Virus), o derivados de patógenos bacterianos como por ejemplo *Diphtheria* (D), *Tetanus* (T), *Salmonella*, *Neisseria*, particularmente *Neisseria Meningitidis* A, B o C, *Borrelia* (por ejemplo Osp A u Osp B o derivados de los mismos), o *Chlamydia*, o *Bordetella* como por ejemplo P. 69, PT y FHA de *B. pertussis* (P), o derivados de parásitos como por ejemplo plasmodium o toxoplasma.

- 45 Las combinaciones anteriores pueden incluir opcionalmente un componente que es un protector contra hepatitis A.

- Los componentes adecuados para su uso en dichas vacunas ya se encuentran disponibles en el mercado y se pueden obtener detalles en la Organización Mundial de la Salud. Por ejemplo, el componente de IPV puede ser la vacuna inactivada de la poliomielitis de Salk. La vacuna contra difteria, tétanos y tos ferina puede comprender un producto acelular como por ejemplo DTPa Infanrix (SmithKline Beecham Biologicals). El componente que proporciona protección contra hepatitis A es preferiblemente el producto conocido como "Havrix" (SmithKline Beecham Biologicals), el cual es una vacuna atenuada muerta derivada de la cepa HM-175 de VHA [véanse "Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A" por F. E. Andre, A. Hepburn y E. D' Hondt, Prog. Med. Virol. Vol 37, páginas 72-95 (1990) y la monografía del producto "Havrix" publicada por SmithKline Beecham Biologicals (1991)]. El componente de hepatitis
- 50 puede comprender el antígeno "S" como en el caso de "Engerix-B".

Resulta ventajoso que la vacuna de combinación según la invención sea una vacuna pediátrica.

- 60 La preparación de la vacuna se describe generalmente en "Vaccine Design - the Subunit and Adjuvant Approach", editado por Michael F. Powell y Mark Newman, Plenum Press. La encapsulación dentro de liposomas es descrita, por ejemplo, por Fullerton, patente de los EE.UU. 4.235.877. La conjugación de proteínas con macromoléculas es descrita, por ejemplo, por Likhite, patente de los EE.UU. 4.372.945 y por Armor y cols., patente de los EE.UU. 4.474.757.

- 65 La cantidad de antígeno en cada dosificación de la vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en vacunas típicas. Dicha cantidad variará dependiendo de qué inmunógenos específicos se empleen. Generalmente se espera que cada dosificación comprenda 1-1000 µg de inmunógeno total, preferiblemente 2-100 µg, de la forma más preferible 4-40 µg. Una cantidad óptima para una vacuna en particular puede determinarse mediante estudios convencionales que requieren observación de los

ES 2 308 962 T3

títulos de anticuerpos y otras respuestas en sujetos. Después de la vacuna inicial, los sujetos pueden recibir una o dos inyecciones de refuerzo en intervalos de aproximadamente 4 semanas.

Los siguientes ejemplos ilustrarán la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1a

Vacuna que comprende DTPa-PRP de Hib-TT- y HBsAg

Producción del conjugado Hib TT

Materiales y Procedimientos

Materiales

El PRP de Hib se extrae y se purifica a partir de cultivos celulares inactivados. El material purificado cumple las especificaciones de la OMS y de los EE.UU. en términos de proteína residual, ácido nucleico, endotoxina, azúcares estructurales y distribución de tamaño molecular.

El toxoide tetánico producido por Behringwerke cumple también las especificaciones de la OMS. El material se purifica adicionalmente mediante precipitación a pH ácido y por cromatografía de filtración en gel para aislar la forma monomérica (150 kDa) de TT.

Activación y química del acoplamiento

Se disolvieron 20 mg de PRP de Hib en 4 ml de NaCl 2 M.

Se añadieron 150 mcl de CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio) a la solución de polisacárido (a partir de una solución madre de 100 mg/ml en acetonitrilo). Un minuto más tarde, se añadieron 300 mcl de trietilamina 0,2 M. La activación del polisacárido se llevó a cabo durante 2 minutos a 0°C a pH 9,5-10.

Se añadieron 20 mg o 40 mg de toxoide tetánico (relación inicial PRP/proteína de 1/1 ó 1/2) a una concentración de 15 mg/ml y la reacción de acoplamiento se llevó a cabo a 25°C durante 1 hora. Después la reacción se detuvo durante 1 hora a 25°C con 3 ml de una solución de glicina 1 M a pH 5,0 y después durante una noche a 4°C.

El conjugado se purificó por cromatografía de filtración en gel usando una columna de filtración en gel Sephacryl HR 500 equilibrada con NaCl 0,2 M. Se determinó el contenido en hidratos de carbono y en proteínas de las fracciones eluidas. El conjugado se agrupó y se filtró en condiciones estériles. Se determinaron a relación de PRP/proteína y el contenido en PS libre en la preparación del conjugado.

Ejemplo 1b

Formulación de la vacuna de combinación con DTP PRPde Hib TT HBsAg

En la técnica se conoce la formulación de DTPa (que comprende toxoide diftérico, toxoide tetánico, toxoide de la tos ferina, pertactina y FHA) con o sin vacunas de la hepatitis B. Por ejemplo dicha vacuna se describe en la solicitud de patente internacional n° WO 93/24148. El conjugado Tal y como se describe en el ejemplo 1 se añade a la vacuna y se mezcla antes de la inyección para los estudios de capacidad inmunogénica.

En los presentes estudios se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- ajuste del contenido en fenoxietanol (bacteriostático) a 5 mg/ml
- ajuste del pH a $6,1 \pm 0,1$
- ajuste de la concentración de PRP hasta 100 mcg/ml
- adición de DTPaHBV (0,5 ml) a 0,1 ml de la solución de PRP-CDAP-TT.

La composición final de la vacuna fue para una dosis:

- 10 mcg de PRP'P

- 25 Lf de D
- 10 Lf de T
- 5 • 25 mcg de PT
- 25 mcg de FHA
- 8 mcg de 69 K
- 10 • 10 mcg de hep B
- 0,35 mg de Al(OH)₃ Behring
- 15 • 0,15 mg de Al(OH)₃ Superpos
- 0,20 mg de AlPO₄ B Superpos
- NaCl 150 mM
- 20 • 3 mg de de 2φEt-OH (→5 mg/ml)
- pH 6,1 ± 0,1
- Volumen 0,6 ml.
- 25

Ejemplo 2

Capacidad inmunogénica

- 30 Se compara la capacidad inmunogénica de las relaciones (peso:peso) de polisacárido derivado de *Haemophilus influenzae* tipo B:proteína (1:3, 1:2 y 1:1) usando dos químicas de acoplamiento diferentes después de una primera y una segunda inoculación en ratas OFA jóvenes.
- 35 Los datos obtenidos a los 28 días después de la primera inoculación de la vacuna muestran claramente un título de anticuerpos anti-PS potenciado que se correlaciona con un contenido proteico disminuido en la vacuna del conjugado cuando el antígeno del conjugado se combina con DTPa-hepatitis B, pero no cuando el conjugado se inyecta solo. Esto queda en clara contraposición con la situación observada cuando la vacuna del conjugado se administra sola, donde la relación más baja PS/TT (es decir más proteína transportadora) da lugar a una mejor respuesta con anticuerpos
- 40 frente al polisacárido (véase el título anti-PS en el día 42 de los grupos 1 a 3 que van de 25 a 18, a 5 µg/ml con una cantidad decreciente de TT, mientras que van de 3, 4 a 8, a 19 µg/ml para los mismos contenidos en TT, pero cuando se proporciona con la vacuna de DTPa-hepatitis B.

Ejemplo 3

- 45 *Efecto de la relación TT/PS sobre la compatibilidad de Hib con DTPa*

- Se inmunizaron grupos de 10 ratas (OFA, 5 semanas de edad, hembras) 2 veces en un intervalo de 24 días a través de la ruta subcutánea con las diferentes vacunas TT-PRP administradas en dos dosis: 0,5 γ de PS/rata (tabla 2) o 0,05 γ de PS/rata (tabla 3). La vacuna de Hib001 se reconstituyó con solución salina o con una dosis de DTPa (lote 119)
- 50 obteniendo una concentración de 10 γ de PS/ml. Las vacunas líquidas se diluyeron con solución salina o con una dosis para ser humano de DTPa obteniendo una concentración de 10 γ de PS/ml. Las vacunas se diluyeron después adicionalmente en solución salina obteniendo 2,5 γ de PS/ml o 0,25 γ de PS/ml. Se inyectó a las ratas con 200 µl de cada vacuna en un tiempo de una hora después de la dilución.
- 55 Los animales se sangraron al día 24 y al día 38 y la absorción de IgG anti-PRP se midió por ELISA en sueros individuales y se expresó en γ/ml. Se calculó el GMT para cada grupo.

Ejemplo 4

- 60 *Comparación de capacidad inmunogénica de DTPa y de vacuna de DTPa-hepatitis B mezclada con una relación baja o "normal" de PRP:TT*

- Se inmunizaron grupos de 10 ratas (OFA, 1 semanas de edad) 3 veces (SC) en intervalos de 2 semanas con 0,5 µg de PS combinado una hora antes de la inyección con una vigésima parte de una dosis para ser humano de DTPa o de DTPa-Hep B. Se sangraron los animales dos semanas después de la tercera dosis y se midieron mediante ELISA
- 65 los anticuerpos contra toxoide de la tos ferina (PT, pertussis toxoid), FHA, pertactina (69 K), toxoide diftérico (D), toxoide tetánico (T) y antígeno de superficie de hepatitis B (HBS, Hepatitis B Surface). Los títulos, expresados como punto medio de la dilución usando una referencia se muestran en la Tabla 4.

ES 2 308 962 T3

Los resultados de este experimento junto con el resultado del ejemplo 3 demuestran que la respuesta frente a Hib se potencia en una vacuna de combinación si la cantidad de proteína en el conjugado se reduce. Sin embargo, no hay una interferencia significativa en la respuesta inmune de ningún otro componente de la vacuna.

TABLA 1

Conjugado	Relación peso:peso Ps/proteína	Conjugado solo		Conjugado más Hep B y DTPa	
		D28 (PI)	D42 (PII)	D28 (PI)	D42 (PII)
Tampón		0,05	0,11	0,05	0,11
PRP-TT	1/3	0,5	25	3,4	29
PRP-TT	1/2	0,6	18	8	40
PRP-TT	1/1	0,3	5	19	38

TABLA 2

Vacuna	PS/PT	α -PRP (γ/ml)			
		Solo		+DTPa	
		d24	d38	d24	d38
NaCl	-	0,002	0,01	0,002	0,01
Hib001 A44 (control)	1/2,5	0,08	51,5	0,63	40,3
Dhib015	1/3	0,88	64,1	0,47	19
Dhib026	1/1	0,07	9,1	1,27	66,7

TABLA 3

Vacuna	PS/PT	Absorción α -PRP (γ/ml)			
		Solo		+DTPa	
		d24	d38	d24	d38
NaCl	-	0,002	0,01	0,002	0,01
Hib001 A44 (control)	1/2,5	0,05	7,0	0,09	14,4
Dhib015	1/3	0,07	17,7	0,12	14,7
Dhib026	1/1	0,02	0,45	0,17	51,6

ES 2 308 962 T3

TABLA 4

Vacuna	Respuesta de anticuerpos después de 3 dosis (d 42)						
	α -PRP	α -D	α -T	α -PT	α -FHA	α -69k	α -HBS
Nada (NaCl)	<0,1	<3	<2	<8	<4	<2	<2
DTPa+Hib (Control PS/TT-1/2,5)	3,4	2847	6976	1518	2119-N	127	-
+Hib (en baja proporción) (PS/TT~1/1)	20,9	2847	9579	2144	3551-S	35	-
DTPa+Hib (PS/TT-1/2,5)	2,8	2001	3622	1603	1123-N	18	3622
+Hib (en baja proporción) (PS/TT~1/1)	11,4	1874	6674	1402	3035-S	12	6674

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna combinada que comprende:

- a) un antígeno polisacárido derivado de *Streptococcus pneumoniae* o *Neisseria meningitidis* A, B o C conjugado con una proteína transportadora, y
- b) la proteína transportadora presente también como antígeno libre,

caracterizada porque la relación de polisacárido a proteína transportadora en el conjugado es de 1:0,3 a 1:2 (peso/peso).

2. Una vacuna combinada tal y como se reivindica en la reivindicación 1, en la que la proteína transportadora es un antígeno de *Diphtheria* o de *Tetanus*.

3. La vacuna combinada de la reivindicación 2, en la que el antígeno de *Diphtheria* o de *Tetanus* es toxoide diftérico o toxoide tetánico.

4. La vacuna combinada de la reivindicación 2, en la que el antígeno de *Diphtheria* o de *Tetanus* es un derivado no tóxico de una toxina procedente de *Diphtheria* o *Tetanus*.

5. Una vacuna combinada tal y como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que relación de polisacárido/proteína transportadora es de 1:0,5 a 1:1,5 (peso/peso).

6. Una vacuna combinada tal y como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende además antígenos protectores contra infección por *Diphtheria*, *Tetanus* y *pertussis*.

7. Una vacuna combinada tal y como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende además un antígeno contra el virus de la hepatitis B.

8. Una vacuna combinada tal y como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende además un antígeno contra el virus de la hepatitis A.

9. Una vacuna combinada tal y como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende además un antígeno que proporciona inmunidad frente a la polio.

10. Una vacuna combinada tal y como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende adicionalmente un adyuvante adecuado.

11. Una vacuna tal y como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en medicina.

12. Un uso de una cantidad eficaz de la vacuna combinada tal y como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 10 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un ser humano susceptible a o que padece una enfermedad infecciosa.