



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 322 352**

⑤1 Int. Cl.:
A61K 39/10 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **04018329 .5**
⑨6 Fecha de presentación : **26.04.1990**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1666057**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

⑤4 Título: **Procedimiento de producción de una vacuna acelular que contiene antígenos de *Bordetella pertussis*.**

③0 Prioridad: **08.05.1989 GB 8910570**

⑦3 Titular/es: **MEDEVA B.V.**
Churchillaan 223
1078 ED Amsterdam, NL

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.06.2009

⑦2 Inventor/es: **Novotny, Pavel**

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.06.2009

⑦4 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Procedimiento de producción de una vacuna acelular que contiene antígenos de *Bordetella pertussis*.

5 La presente invención se refiere a métodos para preparar composiciones de vacunas de *Bordetella pertussis* acelulares, en particular una vacuna de *Bordetella pertussis* acelular que comprende una combinación sinérgica del antígeno de 69 kDa y el antígeno de hemaglutinina filamentososa (FHA) de *B. pertussis*.

10 La *Bordetella pertussis* provoca una enfermedad grave y debilitante en seres humanos, siendo los niños particularmente susceptibles, que se mantiene bajo control en los países desarrollados mediante programas de inmunización a gran escala. Se ha observado que la inmunización es un factor muy importante en la reducción de la enfermedad y que el fracaso en la vacunación puede conducir a una frecuencia aumentada de la enfermedad. Prácticamente en todas las áreas, la inmunización se logra usando una vacuna de *B. pertussis* de células enteras que se ha observado que es relativamente eficaz en la prevención de la enfermedad. Sin embargo, recientemente, la preocupación sobre 15 las reacciones adversas a la vacuna ha conducido a una aceptación menor de la vacuna y al debate acerca de su uso continuado. Algunas de las reacciones adversas indicadas incluyen fiebre, reacciones locales y gritos persistentes. La frecuencia de fiebre y gritos persistentes se ha estimado que ocurre en el 7% de los pacientes (Wardlaw *et al* Medical Microbiology Vol. 2 Immunisation against Bacterial Disease 1983).

20 Con la actual aparición baja de la enfermedad en países desarrollados con programas de inmunización, la proporción beneficio/riesgo está poco definida y muchos médicos creen que el riesgo de inoculación supera a los beneficios ganados mediante la inmunización. Como resultado, muchos niños no se inoculan y ahora existe un riesgo consiguiente de una pandemia de tos ferina. De hecho, en los últimos años la frecuencia de tos ferina y la morbilidad infantil resultante han aumentado ya que el uso de la vacuna de células enteras ha disminuido. Por lo tanto, se ha dirigido un 25 esfuerzo de investigación considerable hacia el desarrollo de vacunas de pertussis mejoradas y, especialmente, vacunas acelulares que carezcan de los componentes asociados con los efectos tóxicos de las vacunas de células enteras que han causado las preocupaciones, mientras se incorporan los componentes necesarios para proteger contra la enfermedad. Los ejemplos de tales esfuerzos se pueden observar en De Magistris *et al* (1988) The Journal of Experimental Medicine, 168(4), 1351-1362; el documento EP-A-0267998 (Institut Pasteur); y Novotny *et al*, resumen titulado “Bordetella specific protective antigen”, International Workshop on *Bordetella pertussis*, agosto de 1988, Rocky Mountain 30 Laboratories, Hamilton, Montana.

La escasez de información con respecto a la identidad y los mecanismos de acción de los restos patógenos, tóxicos y protectores de *B. pertussis* contenidos en las vacunas de células enteras, ha dificultado la búsqueda de una vacuna 35 de *B. pertussis* acelular más segura y eficaz. Por lo tanto, el trabajo se ha concentrado en aislar y purificar los 20 o más antígenos de superficie del organismo *B. pertussis* y describir su capacidad de inducir reacciones inmunes (véase, por ejemplo, González J. Am. Med. Soc. 248 (1) 22-23). Los ejemplos de antígenos que se han sugerido para la investigación incluyen el factor promotor de linfocitosis (toxina pertussis/LPF), la hemaglutinina filamentososa (FHA), los lipopolisacáridos (LPS), los aglutinógenos, la toxina dermonecrótica (DNT), las toxinas sensibles al calor 40 y estables al calor, el factor inhibidor de leucocitos polimorfonucleares, la adenilato ciclasa y otros componentes de superficie. Otros antígenos candidatos propuestos para la investigación incluyen citotoxina traqueal y diversas proteínas de membrana exterior.

45 L. Pillemer (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1950) 75, 704-705) desarrolló una vacuna de extracto temprano que se basaba en células de *B. pertussis* alteradas y se observó que proporcionaba protección, pero no se adoptó comercialmente en vista de la toxicidad de la preparación.

Los ejemplos de vacunas de extractos de *B. pertussis* más recientes que se han sugerido incluyen los descritos en la Memoria Descriptiva de la Patente del RU 2 083 348A (Takeda) que implica la extracción de la endotoxina de los sobrenadantes del cultivo; la Memoria Descriptiva de la Patente Francesa 2 047 886 (Institut Merieux) que implica la extracción de una suspensión microbiana con un tensioactivo aniónico y la Memoria Descriptiva de la Patente Japonesa 58-222032 (Teijin) que comprende una vacuna de subunidades proteicas basada en la toxina de pertussis (LPF).

55 Gran parte del trabajo realizado sobre vacunas de pertussis acelulares se concentra en la posibilidad de basar una vacuna de este tipo en LPF. Sin embargo, se cree que algunos de los efectos adversos observados hasta ahora que se asocian con la vacunación de pertussis están relacionados con la toxina. En combinación con el toxoide tetánico o de la difteria y LPS, es capaz de inducir encefalopatía experimental en ratones susceptibles (L. Steinman, *et al*, Nature (1982) 299, 738-740; Redhead *et al*, Workshop on *B. pertussis*, Nat. Inst. of Biol. Standards & Controls, Holly Hill, 60 Hampstead, Londres, 1983). Por tanto, algunos médicos creen que la LPF puede, posiblemente, ser responsable de daño cerebral si ocurrieran tales complicaciones después de la vacunación.

Sin embargo, hasta la fecha los estudios han generado datos que han conducido a una creencia general de que la LPF es una parte esencial de cualquier vacuna acelular (Bacterial Vaccines, 1984, Capítulo 3, Manclark *et al*, Editor 65 Germanier).

Se ha ensayado una nueva vacuna acelular, disponible actualmente en Japón, en pruebas clínicas controladas en Suecia. Esta vacuna incluye la toxina pertussis (LPF) y FHA o LPF sola (Lancet I 955, 1988). Sin embargo, es-

ta vacuna ha probado no ser tan eficaz como la vacuna de células enteras, proporcionando sólo una protección de aproximadamente el 69%.

Además del poco efecto protector, ocurrieron tres muertes en el grupo de vacuna basado en la toxina que posiblemente pueden estar relacionadas con la vacuna. Tomando en cuenta todos estos datos, la Autoridad de Salud Sueca rechazó autorizar la comercialización de esta denominada "Vacuna Japonesa" en Suecia.

Sin embargo, este ensayo clínico es una ilustración de la creencia de que el antígeno LPF es un componente esencial de la vacuna ya que se ha sugerido que la tos ferina es una enfermedad mediada por toxina y que la protección de los ratones en el ensayo de protección de ratón de pertussis es únicamente dependiente de la presencia de una LPF activa en la preparación (Pittman M. 1984: The Concept of Pertussis as a Toxin-Mediated Disease, Pediatric Infections Disease, 3, 467-486). Se cree que estas suposiciones son incorrectas.

La hemaglutinina filamentosa (FHA) es una proteína que tiene un peso molecular de 107-130 kDa y se presenta como filamentos en el microscopio electrónico. Es una hemaglutinina que se inhibe por el colesterol.

Muchos grupos de investigación han sugerido que la FHA puede ser una candidata de inmunógeno y vacuna importante. (Para una revisión véase Bacterial Vaccines 1984, Capítulo 3, Manclark *et al*, Editor Germanier). Sin embargo, los datos muestran que la FHA sola sólo proporciona protección mínima.

El antígeno de 69 kDa de pertussis es una proteína de membrana exterior, es estable al calor y se puede preparar mediante métodos conocidos en la técnica (véase el documento EP0162639). El uso de 69 kDa por sí mismo no es tan eficaz como la vacuna de células enteras.

El investigador presente ha observado que una combinación de 69 kDa y FHA juntos es, sorprendentemente, más potente que el efecto total de los componentes individuales. La combinación sinérgica de 69 kDa y FHA es provechosa ya que no se requiere LPF y, por consiguiente, se reducen las probabilidades de efectos adversos. Adicionalmente, una vacuna bivalente que contenga sólo 69 kDa y FHA claramente será más fácil y más económica de preparar que una vacuna trivalente que contenga también LPF.

Aparte de eso, mediante una combinación apropiada de antígenos pertussis la dosis eficaz igual de la combinación sugerida es hasta 15 veces menor que, por ejemplo, una combinación de la proteína de 69 kDa y LPF.

Por tanto, de acuerdo con la presente invención se proporciona un método para la preparación de una vacuna acelular, un método que comprende preparar el antígeno de 69 kDa de *Bordetella pertussis* como un componente individual, preparar el antígeno de hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* como un componente individual y mezclar el antígeno de 69 kDa y el antígeno de hemaglutinina filamentosa en cantidades que proporcionen el antígeno de 69 kDa y el antígeno de hemaglutinina filamentosa en una proporción en peso de entre 1:10 y 1:1, para producir un efecto sinérgico en la potencia de la vacuna.

El método proporciona una combinación sinérgica que comprende i) el antígeno de 69 kDa de *B. pertussis* y ii) el antígeno de hemaglutinina filamentosa de *B. pertussis* en una cantidad eficaz para inducir la protección a un mamífero para la exposición posterior a una cepa virulenta de *B. pertussis*.

La proporción de antígeno de 69 kDa a FHA es preferiblemente aproximadamente 1:1.

Los antígenos de 69 kDa y FHA se pueden usar concomitantemente para el tratamiento profiláctico de mamíferos susceptibles a infecciones de *B. pertussis*.

Se pueden incluir excipientes farmacéuticamente aceptables en las vacunas y puede haber medios líquidos adecuados para uso como vehículos para introducir los antígenos en el paciente. Un ejemplo de un vehículo de este tipo es la solución salina. Las proteínas antigénicas pueden estar en solución o suspendidas como un sólido en el vehículo.

La formulación de la vacuna también puede comprender un adyuvante para estimular la respuesta inmune y de ese modo potenciar el efecto de la vacuna. Los adyuvantes convenientes para uso en la presente invención, incluyen, por ejemplo, hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio.

Oportunamente las formulaciones de la vacuna se presentan para contener una concentración final de proteína antigénica en el intervalo de 0,01 a 5 mg/ml, preferiblemente de 0,03 a 2 mg/ml y lo más preferible es que sea de 0,3 mg/ml. Después de la formulación la vacuna se puede incorporar en un recipiente estéril que después se sella y se almacena a baja temperatura, por ejemplo 4°C o se puede secar por congelación.

Para inducir inmunidad a la tos ferina en el hombre se pueden administrar una o más dosis de la vacuna adecuadamente formulada. Se recomienda que cada dosis sea de 0,1 a 2 ml, preferiblemente de 0,2 a 1 ml y lo más preferible es que sea de 0,5 ml de vacuna.

El uso de 69 kDa y FHA proporciona una vacuna para uso en la inducción de inmunidad a la tos ferina en el hombre. Las vacunas se pueden administrar por cualquier método convencional para la administración de vacunas que

incluyen oral y parenteral. El tratamiento puede consistir en una dosis única o una pluralidad de dosis a lo largo de un periodo de tiempo.

Por consiguiente, se describe un método de tratamiento de un mamífero susceptible a infecciones de *B. pertussis* que comprende la administración de antígeno de 69 kDa de *B. pertussis* y FHA simultáneamente.

Ejemplo 1

Preparación de Hemaglutinina Filamentosa (FHA)

La FHA se puede preparar en métodos bien conocidos en la técnica (véase Arai y Munoz J. J (1979) *Infection and Immunity* 25 764-767; Ashworth *et al* (1982) *Infect. Immun.* 37 1278-1281; Cowel *et al* *Bacterial Vaccines*, págs. 371-379 *Seminars in Infectious diseases* Vol. IV (1982); Sato *et al* (1983) *Infect. Immun.* 41 313-320). Sin embargo, la FHA en el siguiente procedimiento se preparó de acuerdo con el protocolo siguiente.

Purificación de FHA: Se cultivaron *B. pertussis* Tomaha o BP357 (mutante transposón Tn5 de AA. Weiss *et al* (1983) que no secreta la LPF) o W28ΔLPF obtenidas de R. Rappuloi en medio de Stainer y Scholte (0,05 Tris) en matraces Costar de 650 ml (150 ml en cada uno) durante 5 días a 37°C (Sato *et al* 1983 anteriormente). Antes de la centrifugación (30 minutos a 6000 x g) se añadió a los cultivos 1,10-fenantrolina monohidrato 50 μM como inhibidor de proteólisis. El sobrenadante libre celular ajustado a pH 8,7 (usando NaOH 5 N) se aplicó a una columna de 30 x 350 mm de hidroxipatita esférica (BHD) a un caudal de 500 ml/h. (Todas las operaciones a temperatura ambiente). Después la columna se lavó en la habitación fría (+4°C) hasta que se consiguió una línea basal estable a un caudal de 50 ml/h con (a) solución salina tamponada con fosfato 10 mM, pH 8,0, (b) solución salina tamponada con fosfato 100 mM, pH 8,0 y finalmente (c) el material retenido se eluyó con NaCl 0,5 N en solución salina tamponada con fosfato 100 mM, pH 7,0. Las fracciones pico que aglutinan glóbulos rojos se combinaron (se añadieron volúmenes de 10 μl de cada fracción suspendidos en 50 μl de solución salina tamponada con fosfato y una cantidad igual de glóbulos rojos lavados al 0,5% y se incubaron durante 1-2 horas a 37°C). La combinación se dializó durante la noche frente a 20-30 volúmenes de tampón Bis-Tris/HCl 0,025 M, pH 7,1 a 4°C. La FHA precipitada se recogió en una centrífuga (20 minutos a 8000 x g). La siguiente etapa se inspiró en Cowel *et al* (1983) que observó que la FHA (así como la LPF) es soluble en tampón beta alcalino 40 mM, pH 3,5. La FHA precipitada se solubilizó en el volumen más pequeño posible de tampón β-alanina (3,57 g de β-alanina y 0,35 g de ácido fórmico por litro), las partes insolubles se retiraron por centrifugación y el sobrenadante transparente se aplicó a una columna (25 x 800 mm) de Ultrogel AcA 34 o AcA 44 equilibrado y eluido con el mismo tampón para retirar las impurezas. El material hemaglutinante retenido apareció en un pico eluido mediante tampón Tris/HCl 0,05 M que contenía NaCl 0,5 M (pH 7,2). Las fracciones del pico principal y que tenían propiedades hemaglutinantes se combinaron y se mantuvieron congeladas o se reprecipitaron por diálisis frente a tampón Bis-Tris/HCl 0,025 M, pH 7,1 y se disolvieron en un volumen más pequeño de tampón β-alanina. La solubilidad es aproximadamente 3,0 mg de FHA/ml. El producto final obtenido de ese modo, de las cepas Tomaha, BP357 o W28 LPF no contiene cantidad detectable de LPF medida mediante un ensayo de células CHO (que fue negativo a una concentración de 2-3 μg de FHA por pocillo único que contenía 200 μl de cultivo tisular; sensibilidad del ensayo: 1-2 pg de LPF por pocillo da una aglutinación positiva) o por sensibilización a histamina. Se inyectaron dosis de 50 μg de FHA por vía intraperitoneal a los ratones N: NIH-S y se expusieron 4 días después por inyección intraperitoneal con 4 mg de clorhidrato de histamina. Ninguno de ellos murió. El material congelado (a -20 o -40°C) a pH ácido parece estable considerado a partir de su reactividad a ELISA y apariencia en el SDS-PAGE: Forma de manera dominante tres bandas fuertes en la región de 150-100 kD.

Ejemplo 2

Se preparó antígeno de 69 kDa de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud publicada de Patente Europea N° 0162 639, usando cepas BP357 o W28ΔLPF de *B. pertussis* y se inmunopurificó usando el anticuerpo monoclonal BB05 - depositado en el Public Health Laboratory Service Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury Wiltshire SP4 OJG Reino Unido, bajo el N° 90020103 el 1° de febrero de 1990.

Ejemplo 3

Ensayo de Kendrick. Este se realizó de acuerdo con los Requerimientos para la Vacuna de Pertussis W.H.O usando ratones NIH-S exogámicos (OLAC, categoría 3, libre de la mayoría de patógenos incluyendo *B. bronchiseptica*), que pesaban 14-16 g. Los antígenos, en volúmenes de 0,5 ml, se inocularon por vía intraperitoneal como una mezcla y comprendían una dilución máxima y tres diluciones triples en serie. Después de dos semanas los ratones se expusieron por vía intracerebral usando la cepa de desafío recomendada 18-323 (DL₅₀ -400). El número de supervivientes en cada grupo se usó para el cálculo de la potencia relativa con respecto a la Vacuna de Referencia Pertussis Británica 66/84 usando un programa de análisis probit de líneas paralelas. También se realizó un ensayo comparativo usando una vacuna de 69 kDa/LPF. Los resultados se muestran en la Tabla 1. En este experimento la proteína de 69 kDa y la FHA se originaron a partir de la cepa BP357.

ES 2 322 352 T3

TABLA 1

	69 kd (μ g)	FHA (μ g)	Supervivientes
5	20	20	13/16
	6,7	6,7	12/16
10	2,2	2,2	8/16
	0,74	0,74	8/16
	69 kd (μ g)	LPF (ng)	
15	20	100	8/16
	6,7	33	6/16
	2,2	11	0/16
20	0,74	3,7	1/16
	66/84	U.I.	
	Células enteras RU	0,25	9/15
25	referencia	0,08	9/16
	vacuna	0,028	2/16
		0,009	1/16
30			

Estos datos se calcularon de acuerdo con la metodología de análisis probit de líneas paralelas. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Los resultados muestran claramente que la vacuna de 69 kDa/FHA es más potente que la de 69 kDa/LPF y al menos tan, si no más, potente como la vacuna de células enteras.

Ejemplo 4

Se usaron combinaciones y/o antígenos individuales que se originaron a partir de la cepa W28 Δ LPF de *Bordetella pertussis* en otro ensayo de Kendrick. Ya que en esta cepa se ha bloqueado el gen de la toxina completo, la posibilidad de que estas preparaciones estuvieran contaminadas por LPF es nula. El o los antígenos en volúmenes de 0,5 ml de inocularon por vía intraperitoneal, individualmente o como mezclas y comprendían una dosis máxima y tres diluciones cuádruples. Después de dos semanas los ratones se expusieron por vía intracerebral usando una cepa de desafío 18-323 (DL50 aprox. 400). El número de supervivientes en cada grupo se usó para el cálculo de la potencia relativa con respecto a la Vacuna de Referencia Pertussis Británica 66/84 usando un programa de análisis probit de líneas paralelas. La Referencia Británica 66/84 se usó a una dilución máxima que contenía 0,5 U.I y tres diluciones cuádruples en serie. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 2.

TABLA 2

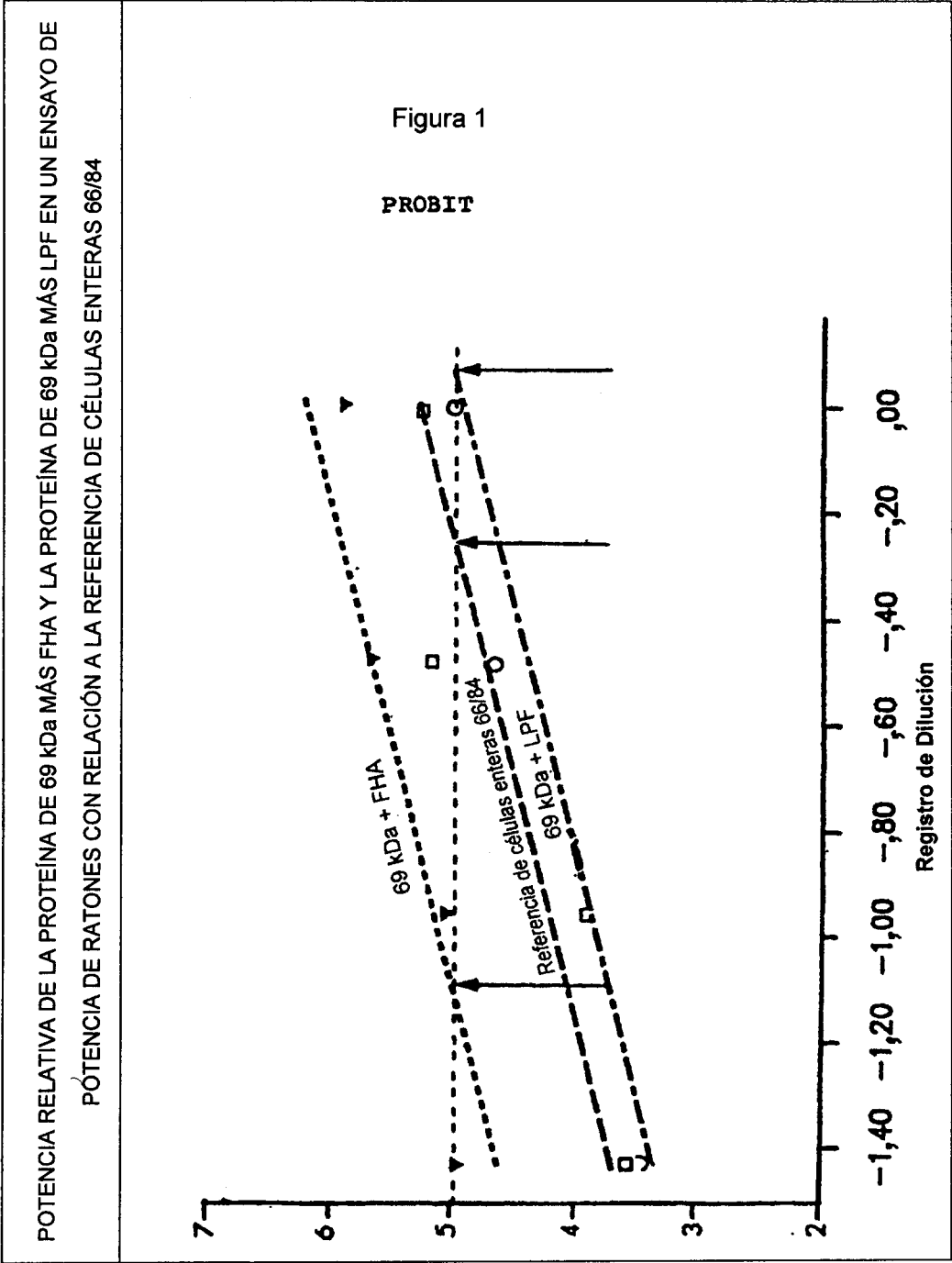
69 kDa (μ g)	FHA (μ g)	LPF (ng)	SUPERVIVIENTES/TOTAL
20,0	-	-	0/18
5,0	-	-	1/18
1,25	-	-	1/18

ES 2 322 352 T3

	0,325	-	-	0/18
5	20,0	-	100,0	8/17
	5,0	-	20,0	3/17
	1,25	-	5,0	0/20
10	0,325	-	1,25	0/18
	20,0	20,0	-	14/18
	5,0	5,0	-	8/18
15	1,25	1,25	-	3/18
	0,325	0,325	-	1/18
	-	20,0	-	0/17
20	-	5,0	-	6/18
	-	1,25	-	4/18
	-	0,325	-	1/17
25	Referencia de células enteras 66/84			
	0,5 U.I			16/17
	0,125			13/18
30	0,031			8/17
	0,008			0/18
35	<u>Titulación de exposición</u>			
	Dosis de exposición			0/11
	"	"	"	1/50
40	"	"	"	1/250
	"	"	"	2/10
	"	"	"	1/1250
	"	"	"	6/9

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de una vacuna acelular, donde el método comprende preparar el antígeno de 69 kDa de *Bordetella pertussis* como un componente individual, preparar el antígeno de hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* como un componente individual y mezclar el antígeno de 69 kDa y el antígeno de hemaglutinina filamentosa en cantidades que proporcionen el antígeno de 69 kDa y el antígeno de hemaglutinina filamentosa en una proporción en peso de entre 1:10 y 1:1, para producir un efecto sinérgico en la potencia de la vacuna.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la vacuna está desprovista de la toxina de *B. pertussis*.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en el que el antígeno de 69 kDa y el antígeno de hemaglutinina filamentosa se proporciona en una proporción en peso de aproximadamente 1:1.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3 en el que la proteína antigénica se proporciona en una concentración en el intervalo de 0,01 a 5,0 mg/ml.



POTENCIA RELATIVA DE LA PROTEÍNA DE 69 kDa MÁS FHA Y LA PROTEÍNA DE 69 kDa MÁS LPF EN UN ENSAYO DE POTENCIA DE RATONES CON RELACIÓN A LA REFERENCIA DE CÉLULAS ENTERAS 66/84
(ENSAYO B)

