



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 271 969**

51 Int. Cl.:
A61K 39/295 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97928089 .8**

86 Fecha de presentación : **02.07.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0914153**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.1999**

54 Título: **Vacunas DTP-polio multivalentes.**

30 Prioridad: **02.07.1996 US 672530**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **Sanofi Pasteur Limited**
1755 Steeles Avenue West
Toronto, Ontario M2R 3T4, CA

72 Inventor/es: **Fahim, Raafat, E., F.;**
Tan, Larry, U., L.;
Barreto, Luis;
Thippawong, John y
Jackson, Gail, E., D.

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 271 969 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 DTP-polio multivalentes.

5 La presente invención se refiere a vacunas multivalentes, particularmente para la administración pediátrica.

La tos ferina o pertussis es una infección del tracto respiratorio superior severa altamente contagiosa causada por *Bordetella pertussis*. La Organización Mundial de la Salud estima que existen 60 millones de casos de pertussis al año y 0,5 a 1 millón de muertes asociadas (ref. 1 a lo largo de la presente memoria, se hace referencia a diversas referencias en paréntesis para describir más completamente el estado de la técnica a la que se refiere la presente invención. Se presenta información bibliográfica completa para cada cita al final de la memoria, inmediatamente antes de las reivindicaciones. Las exposiciones de estas referencias se incorporan como referencia a la presente memoria).

15 En las poblaciones no vacunadas, se ha observado en niños de menos de 5 años de edad una tasa de incidencia de pertussis de hasta el 80% (ref. 2). Aunque la pertussis se considera generalmente una enfermedad infantil, existen evidencias crecientes de enfermedad clínica y asintomática en adolescentes y en adultos (refs. 3, 4 y 5).

La introducción de vacunas de célula completa compuestas de organismos *B. pertussis* inactivados químicamente y por calor en los años 1940 fue responsable de una drástica reducción de la incidencia de la tos ferina causada por *B. pertussis*. Las tasas de eficacia de las vacunas de células completas se han estimado que son de hasta el 95% dependiendo de la definición del caso (ref. 6). Aunque la infección por *B. pertussis* proporciona una inmunidad que dura toda la vida, existe una evidencia creciente de que la protección se va reduciendo tras la inmunización con vacunas de células completas (ref. 3). Varios informes que citan una relación entre la vacunación de células completas de pertussis, reactogenicidad y efectos secundarios graves han conducido a una reducción de la aceptación de la vacuna y a la consecuente renovación de la epidemia (ref. 7). Más recientemente se han desarrollado vacunas de componente pertussis definido.

Antígenos para vacunas de pertussis definidas

30 Se han desarrollado diversas vacunas de pertussis acelulares e incluyen los antígenos de *Bordetella pertussis*, la toxina pertussis (PT), la hemaglutinina filamentosa (FHA), la proteína de membrana externa de 69 kDa (pertactina) y los aglutinógenos fimbriales (ver la Tabla 1 posteriormente. Las Tablas se encuentran al final de la memoria).

Toxina pertussis

35 La toxina pertussis es una exotoxina que es un elemento de la familia A/B de las toxinas bacterianas con actividad ADP-ribosiltransferasa (ref. 8). El grupo A de estas toxinas muestra la actividad ADP-ribosiltransferasa, y la parte B media en la unión de la toxina a los receptores de la célula huésped y en la traslocación de A a su sitio de acción. PT también facilita la adherencia de *B. pertussis* a células epiteliales ciliadas (ref. 9) y también desempeña un papel en la invasión de macrófagos por *B. pertussis* (ref. 10).

Todas las vacunas de pertussis acelulares han incluido PT, que se ha propuesto como factor de virulencia mayor y antígeno protector (refs. 11, 12). La infección natural por *B. pertussis* genera respuestas tanto humorales como mediadas por células contra PT (refs. 13 a 17). Los niños disponen de anticuerpos anti-PT derivados trasplacentariamente (refs. 16, 18) y el calostro humano que contenía anticuerpos anti-PT resultó eficaz en la protección pasiva de ratones frente a la infección con aerosol (ref. 19). Se ha demostrado una respuesta inmunológica mediada por células (CMI) contra subunidades de PT tras la inmunización con una vacuna acelular (ref. 20) y se ha generado una respuesta CMI contra PT tras la vacunación de células completas (ref. 13). La PT inactivada químicamente en vacunas de células completas o de componente resulta protectora en modelos animales y en seres humanos (ref. 21). Además, los anticuerpos monoclonales específicos para la subunidad S1 protegen contra la infección por *B. pertussis* (refs. 22 y 23).

55 Los efectos fisiopatológicos principales de PT se deben a su actividad ADP-ribosiltransferasa. PT cataliza la transferencia de ADP-ribosa de NAD a la proteína de unión de nucleótido guanina Gi, alterando de esta manera el sistema regulador celular de la adenilato ciclasa (ref. 24). La PT evita asimismo la migración de los macrófagos y los linfocitos a los sitios de inflamación e interfiere con la fagocitosis mediada por neutrófilos y la eliminación de bacterias (ref. 25). Se han utilizado varios ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la actividad enzimática de S1 y/o de PT, incluyendo la ribosilación-ADP de la transducina bovina (ref. 26), el ensayo de agrupación de células de ovario de hámster chino (CHO) (ref. 27), la sensibilización a la histamina (ref. 28), la leucocitosis y la NAD glucohidrolasa. Cuando se exponen a PT, las células CHO desarrollan una morfología agrupada característica. Este fenómeno depende de la unión de PT, y la posterior traslocación y actividad ADP-ribosiltransferasa de S1 y de esta manera el ensayo de agrupación de las células CHO se utiliza ampliamente para someter a ensayo la integridad y toxicidad de las holotoxinas de PT.

Hemaglutinina filamentosa

65 La hemaglutinina filamentosa es un polipéptido no tóxico de gran tamaño (220 kDa) que media en la unión de *B. pertussis* a células ciliadas del tracto respiratorio superior durante la colonización bacteriana (refs. 9, 29). La infección natural induce anticuerpos anti-FHA y la inmunidad mediada por célula (refs. 13, 15, 17, 30 y 31). Se encuentran anticuerpos anti-FHA en el calostro humano y también se transmiten trasplacentariamente (refs. 17, 18 y 19). La

vacunación con vacunas de pertussis de células completas o acelulares genera anticuerpos anti-FHA y las vacunas acelulares que contienen FHA inducen asimismo una respuesta CMI a FHA (refs. 20, 32). La FHA es un antígeno protector en un modelo de reto respiratorio de ratón tras la inmunización activa o pasiva (refs. 33, 34). Sin embargo, por sí sola la FHA no proporciona protección en el ensayo de potencia del reto intracerebral en el ratón (ref. 28).

5

Proteína membranal externa de 69 kDa (pertactina)

La proteína de 69 kDa es una proteína de membrana externa originalmente identificada a partir de *B. bronchiseptica* (ref. 35). La proteína también es conocida como pertactina y P.69. Se ha demostrado que es un antígeno protector contra *B. bronchiseptica* y posteriormente se identificó tanto en *B. pertussis* como en *B. parapertussis*. La proteína de 69 kDa se une directamente a las células eucarióticas (ref. 36) y la infección natural por *B. pertussis* induce una respuesta humoral anti-P.69 (ref. 14) y P.69 también induce una respuesta inmunológica mediada por células (refs. 17, 37 y 38). La vacunación con vacunas de células completas o acelulares induce anticuerpos anti-P.69 (refs. 32, 39) y las vacunas acelulares inducen una CMI contra P.69 (ref. 39). La pertactina protege a ratones frente al reto en aerosol de *B. pertussis* (ref. 40) y en combinación con FHA, protege en el ensayo de reto intracerebral contra *B. pertussis* (ref. 41). La transferencia pasiva de anticuerpos anti-P.69 monoclonales o policlonales también protege a ratones frente al reto en aerosol (ref. 42).

Aglutinógenos

20

Los serotipos de *B. pertussis* se definen por sus fimbrias aglutinantes. La OMS recomienda que las vacunas de células completas incluyen aglutinógenos (Aggs) de los tipos 1, 2 y 3 debido a que no presentan protecciones cruzadas (ref. 43). Agg1 es no fimbrial y se encuentra en todas las cepas de *B. pertussis*, mientras que las Aggs de serotipos 2 y 3 son fimbriales. La infección o inmunización natural con vacunas de células completas o acelulares induce anticuerpos anti-Agg (refs. 15, 32). Puede generarse una respuesta inmunológica específica mediada por células en ratones con Agg2 y Agg3 tras la infección en aerosol (ref. 17). Las Aggs 2 y 3 son protectoras en ratones frente al reto respiratorio y el calostro humano que contiene anti-aglutinógenos también resulta protector en este ensayo (refs. 19, 44, 45).

Vacunas de pertussis acelulares

La primera vacuna pertussis acelular desarrollada fue la vacuna de dos componentes PT + FHA (JNHI 6) de Sato *et al.* (ref. 46). Esta vacuna se preparó mediante la copurificación de antígenos PT y FHA a partir del sobrenadante de cultivo de la cepa Tohama de *B. pertussis*, seguido de la producción de toxoide con formalina. Las vacunas acelulares de diversos fabricantes y de diversas composiciones se han utilizado con éxito para inmunizar niños japoneses frente a la tos ferina desde 1981, resultando en una drástica reducción de la incidencia de la enfermedad (ref. 47). Se sometieron a ensayo la vacuna JNHI 6 y una vacuna monocomponente de toxoide PT (JNHI 7) en un ensayo clínico de grandes dimensiones en Suecia en 1986. Los resultados iniciales indicaban una menor eficacia que la eficacia constatada de una vacuna de células completas, pero los estudios de seguimiento han demostrado que resulta más efectiva contra la enfermedad más leve diagnosticada mediante procedimientos serológicos (refs. 48, 49, 50, 51). Sin embargo, se descubrió evidencia de la reversión a la toxicidad de la PT inactivada con formalina en estas vacunas. También se descubrió que estas vacunas protegían contra la enfermedad y no contra la infección.

En la actualidad se están evaluando varias nuevas vacunas de pertussis acelulares y de componente, incluyendo combinaciones de PT, FHA, P.69 y/o aglutinógenos, y éstas se indican en la Tabla 1. Se han utilizado varias técnicas de destoxicación química para PT, incluyendo la inactivación con formalina (ref. 46), con glutaraldehído (ref. 52), con peróxido de hidrógeno (ref. 53) y con tetranitrometano (ref. 54).

Tétanos

50

El tétanos es una infección aguda causada por *Clostridium tetani*. La enfermedad se caracteriza por contracciones musculares dolorosas severas, acompañadas de hipersensibilidad, hiperreflejos y estimulación autonómica incrementada de la parte o partes corporales afectadas. Los estímulos leves pueden causar espasmos musculares reflejos severos. Puede presentarse fiebre debido a los espasmos musculares extremos. El tétanos puede ser generalizado, implicando cara, cuello, abdomen y tronco, o localizarse en una parte corporal específica (sitio de la lesión). La implicación del músculo masetero de la cara resulta en trismo o bloqueo de las mandíbulas, dando lugar a la clásica expresión facial conocida como "*risus sardonius*" (ref. 78).

C. tetani existe en forma de organismo no patogénico en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y de animales. El organismo también se encuentra en suelo contaminado por heces y puede sobrevivir en el suelo durante años en forma de esporas infecciosas (ref. 79).

El tétanos resulta del crecimiento anaeróbico de *C. tetani* y la producción de neurotoxinas en las heridas contaminadas. La infección está causada por la introducción de materiales contaminados por organismos o esporas en el tejido. El caso más frecuente es la infección a través de una herida penetrante. Sin embargo, en muchos casos no puede obtenerse ningún historial de la lesión. La presencia de tejido necrótico o isquémico facilita el crecimiento del bacilo (ref. 78).

ES 2 271 969 T3

La prevención de la infección es mediante vacunación y el buen cuidado de la herida, incluyendo su limpieza cuidadosa y el desbridamiento de los tejidos desvitalizados. Los individuos con heridas contaminadas y que no han completado la serie de vacunaciones deben recibir tanto la vacuna del tétanos como la inmunoglobulina del tétanos.

5 El tratamiento del síndrome principalmente es de soporte y puede incluir el soporte respiratorio, la administración de la antitoxina tetánica y la limpieza cuidadosa de las heridas infectadas. A pesar de los cuidados médicos modernos las tasas de fatalidad siguen siendo de hasta 30 a 90% (ref. 79). Esto resulta particularmente cierto para las personas de edad avanzada. La infección natural no siempre produce inmunidad frente a una infección posterior.

10 La prevención de la infección mediante vacunación es el procedimiento más efectivo de controlar la enfermedad. Debido a la introducción de la vacunación universal, el tétanos ahora es extremadamente raro en los países desarrollados. Aparecen casos casi exclusivamente en individuos que no han completado su serie de vacunaciones o que no han recibido las dosis de refuerzo apropiadas. Los individuos deben recibir una dosis de refuerzo una vez cada diez años.

15 *Difteria*

La difteria es una infección aguda causada por la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*. El sitio principal de infección es el tracto respiratorio superior (nariz, faringe, laringe y tráquea) (ref. 80). La lesión característica, un resultado de la citotoxina bacteriana, son parches de pseudomembrana grisácea rodeada de inflamación. Esto se ve acompañado de linfadenopatía cervical, hinchazón y edema de la garganta. En casos severos, la hinchazón puede progresar hasta el punto de la obstrucción (difteria laríngea). Entre otras complicaciones se incluyen miocarditis, efectos sobre el sistema nervioso central (neuropatías craneales, motoras y sensoriales, tales como la parálisis ascendente) y la trombocitopenia. Otras membranas mucosales pueden verse afectadas menos frecuentemente. La presentación clínica puede variar de la infección asintomática a la multisistema fulminante y la muerte (ref. 79). Las infecciones cutáneas y de heridas con difteria son frecuentes en las zonas tropicales y se han descrito con frecuencia en la población indigente de los Estados Unidos. El único reservorio de *C. diphtheriae* es el ser humano (ref. 79).

Puede realizarse un diagnóstico presuntivo basándose en la observación clínica de las lesiones características, pero debe confirmarse mediante el examen bacteriológico de las lesiones. Si existe una fuerte sospecha clínica de difteria, el tratamiento debe iniciarse inmediatamente con antibióticos (penicilina o eritromicina) y antitoxina diftérica, incluso si no se ha confirmado el diagnóstico. La mortalidad se incrementa cuanto más se espere tras la aparición de los síntomas clínicos (ref. 80). La tasa de casos fatales se encuentra comprendida entre cinco y diez por ciento a pesar de los modernos cuidados médicos (ref. 79) y se produce principalmente en personas muy jóvenes y de edad avanzada. La infección natural no siempre produce inmunidad frente a una infección posterior (ref. 80).

La transmisión es mediante contacto directo con secreciones o descargas de un individuo infectado. Los individuos son contagiosos siempre que se observen bacterias en las secreciones. Esto puede prolongarse hasta cuatro semanas después de la infección. La transmisión también puede producirse con fomitas infectadas (ref. 79). Se recomienda el aislamiento estricto de los casos.

Raramente los individuos pueden convertirse en portadores y liberar organismos hasta seis meses después de la infección. Los portadores no inmunizados deben vacunarse inmediatamente con la serie completa. El tratamiento con antibióticos elimina el carácter de portador y la infectividad de los casos en 4 días (ref. 80).

45 *Poliomielitis*

Las vacunas tanto inactivadas (IPV) como vivas atenuadas (OPV) de poliovirus han resultado efectivas en el control de la poliomiélitis en todo el mundo. En la actualidad se encuentra autorizada una vacuna DPT-IPV combinada en Europa y en Canadá, y se ha demostrado que resulta segura y efectiva en millones de niños en todo el mundo.

50 *Haemophilus influenzae tipo b*

Antes de la disponibilidad de vacunas efectivas, la *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) era una causa mayor de infecciones transportadas en sangre de meningitis invasiva en niños pequeños y era la causa principal de meningitis en los primeros 2 años de vida (ref. 81). Aproximadamente el 10% de las víctimas de meningitis por *Haemophilus influenzae* mueren a pesar de los cuidados médicos. Son frecuentes las secuelas permanentes en los supervivientes. La inmunización contra *Haemophilus influenzae* se inició en Canadá en 1987 con una vacuna polisacárida (polirribosa ribitol fosfato [PRP] de *Haemophilus influenzae* tipo b). Se consiguió una inmunogenicidad mejorada en niños de 18 meses de edad y más con la introducción en 1988 de una vacuna consistente de PRP conjugada con toxoide de la difteria (PRP-D). Desde 1992, ha sido posible la inmunización de niños con la autorización de vacunas de conjugado de PRP inmunogénicas en niños de menos de 1 año de edad (PRP conjugada con toxoide tetánico o PRP-T). La utilización de estas vacunas conjugadas de *Haemophilus influenzae* se ha asociado a una reducción drástica de la incidencia de infección invasiva por *Haemophilus* en Canadá y en otros sitios (ref. 82). Dos estudios clínicos canadienses con prácticamente 900 niños en la Columbia británica y en Alberta han demostrado que la PRP-T liofilizada puede reconstituirse con DPT (COMBIPACK) (ref. 83) o adsorberse a DPT-Polio (PENTA™) (ref. 84), además del diluyente salino habitual. Los estudios clínicos con más de 100.000 niños en todo el mundo han demostrado la eficacia de PRP-T liofilizado (ActHib™). Más del 90% han alcanzado niveles anti-PRP considerados protectores ($\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$) tras 3 dosis de PRP-T desde los 2 meses, otras una sola dosis de PRP-T administrada después de los 12 meses de edad.

La proporción que alcanzó niveles de protección de largo plazo ($> 1,0 \mu\text{g/ml}$) variaba entre 70 y 100% dependiendo del estudio. Se han comercializado millones de dosis de PRP-T en Canadá desde 1992. Los casos de infección invasiva por *Haemophilus* tras la vacunación con PRP-T son raros y pueden asociarse a enfermedades tales como la inmunodeficiencia (ref. 85).

5

Vacunas de combinación

Aunque existen muchos beneficios reales y potenciales de las vacunas que combinan antígenos para proporcionar protección frente a múltiples patógenos, estas combinaciones pueden presentar un efecto perjudicial sobre la inmunogenicidad de los componentes individuales. Las combinaciones de difteria y toxoides tetánicos con vacuna de pertussis de células completas (DTP) se han encontrado disponible durante más de 50 años y la respuesta de anticuerpos a la combinación es superior a la de los componentes individuales, quizás como resultado de un efecto adyuvante de la vacuna de pertussis de células completas. Las combinaciones de DTP que también incluyen vacuna de poliovirus inactivado se encuentran autorizadas en muchas jurisdicciones, aunque la respuesta de anticuerpos a los antígenos de pertussis puede resultar reducida por esta combinación (refs. 69 a 71). El efecto de la combinación de vacunas DTP con vacuna de conjugado de Hib ha sido variable. Los estudios con una DTP francesa y PRPT demostraron una seguridad similar pero una respuesta de anticuerpos reducida contra PRP (refs. 72 a 73), mientras que estudios con una vacuna DTP canadiense y PRPT no mostraron ningún efecto sobre la respuesta de PRP, aunque niveles menores de aglutinógenos de pertussis y sensibilidad incrementada en el sitio de inyección en el grupo de inmunización combinada (refs. 74, 75).

Están apareciendo datos sobre el efecto de la combinación de vacunas APDT con vacuna conjugada de Hib. En niños de dos meses de edad a los que se administraron tres dosis de una vacuna de pertussis-difteria-tétanos acelular (APDT) combinada con una vacuna conjugada de Hib (PRP-T), la respuesta de anticuerpos contra PRP fue significativamente menor que en el grupo que recibió inyecciones separadas el mismo día (ref. 76). Se informó de resultados similares con otra vacuna pertussis-difteria-tétanos acelular combinada con PRP-T administrada en las tres primeras dosis (ref. 77).

En contraste con otros estudios informados, los niños inmunizados con la vacuna combinada presentaba una respuesta de anticuerpos superior contra PRP, difteria, y algunos de los antígenos de pertussis en comparación con niños que recibieron PRP en una visita diferente. Pueden existir varios motivos para la inmunogenicidad equivalente o mejor para estas vacunas cuando se administran en forma de inyección combinada y la inmunogenicidad reducida informada con otros productos. Todas las vacunas de pertussis acelulares y de componente no son idénticas en su contenido antigénico, procedimiento de producción de toxoide, adyuvante o conservante. Sin embargo, se ha informado de inmunogenicidad reducida con vacunas de pertussis acelulares que contienen PT, FHA y 69K (ref. 77) y que contienen PT, FHA, 69K y fimbrias (ref. 76).

La vacuna APDT de cinco componente examinada en el presente estudio se encontró que presentaba una eficacia protectora del 85% (Ejemplo 5) (IC al 95% de 81/89) en un ensayo clínico de fase III completado recientemente en Suecia bajo los auspicios de los National Institutes of Health (ref. 78).

Las vacunas de combinación disponibles comercialmente en la actualidad pueden no contener formulaciones apropiadas de antígenos apropiados en formas inmunogénicas apropiadas para conseguir un nivel de eficacia deseado en una población humana susceptible a pertussis.

45

Gryhrs *et al.*, resumen E-92, 95th General Meeting of the Society for Microbiology, Washington DC, USA (que se informa que tuvo lugar el 21-25 de mayo de 1995) informa de inmunidad de células T en niños vacunados con PT destoxificada con peróxido de hidrógeno en una vacuna de combinación DtaP-IPV. El resumen no proporciona detalles sobre la formulación, más allá de la presencia *simpliciter* de antígenos para D y T, de antígenos de pertussis acelulares y de IPV.

50

Mallet *et al.*, resumen nº 19, 14th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Elsinore, Denmark (que se informa que tuvo lugar el 18-21 de junio de 1996) informa de inmunización primaria com vacuna DTaP-IPV-Act-HIB acelular combinada administrada a los 2-3-4 o 2-4-6 meses de edad. El resumen no proporciona detalles sobre la formulación, más allá de la presencia *simpliciter* de los antígenos para D y T, de antígenos de pertussis acelulares e IPV, y del antígeno denominado con la marca comercial Act-HIB.

55

Begue *et al.*, resumen nº 20, 14th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, *supra*, informa de la evaluación de una dosis de refuerzo de vacuna DTPa-IPV, con o sin Hib, en comparación con la vacuna comercial DTPw-IPV-Hib. El resumen no proporciona detalles sobre la formulación, más allá de la presencia *simpliciter* de los antígenos para D y T, de antígenos de pertussis acelulares y/o de IPV/Hib.

60

Hronowski *et al.*, resumen E78, 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, Georgia, USA (que se informa que tuvo lugar el 16-20 de mayo de 1993) informa de la inmunogenicidad de una nueva vacuna conjugada de polisacárido Hib-TT y las inmunogenicidades de los componentes individuales en la vacuna pentavalente Hib-TT + DtaP + IPV. El resumen afirma que el polisacárido capsular se ha acoplado covalentemente al portador proteína del toxoide tetánico mediante el procedimiento de aminación. No se dan a conocer detalles sobre la composición antigénica detallada de las vacunas implicadas.

65

ES 2 271 969 T3

Resultaría deseable proporcionar vacunas de combinación eficaces que comprendan componentes acelulares de pertussis que contengan cantidades relativas seleccionadas de antígenos seleccionados.

5 La presente invención se refiere, tal como se define posteriormente en la presente memoria, a vacunas de combinación o multivalentes que contienen componentes acelulares de vacuna de pertussis y procedimientos de utilización de los mismos.

10 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición inmunogénica multivalente para proporcionar protección en un huésped contra la enfermedad causada por la infección por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, poliovirus y/o *Haemophilus influenzae*, que comprende:

(a) toxoide pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina y aglutinógenos en forma purificada;

15 (b) toxoide tetánico,

(c) toxoide de la difteria,

(d) poliovirus inactivado, y, opcionalmente,

20 (e) un conjugado opcionalmente liofilizado de una molécula portadora seleccionada de entre el toxoide tetánico y el toxoide de la difteria, y un polisacárido capsular del tipo *Haemophilus influenzae*,

25 que se formula como vacuna para la administración *in vivo* a un huésped y en la que, en cada dosis humana, se encuentra presente dicho toxoide pertussis en una cantidad de 5 a 30 μg de nitrógeno, dicha hemaglutinina filamentosa se encuentra presente en una cantidad de 5 a 30 μg de nitrógeno, dicha pertactina se encuentra presente en una cantidad de 3 a 15 μg de nitrógeno y dichos aglutinógenos se encuentran presentes en una cantidad de 1 a 10 μg de nitrógeno.

30 La composición inmunogénica de esta manera se formula como vacuna para la administración *in vivo* en el huésped de manera que la inmunogenicidad de los componentes individuales no resulta perjudicada por los otros componentes individuales de la composición.

La composición inmunogénica puede comprender además un adyuvante, particularmente hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

35 En una forma de realización específica, la composición inmunogénica puede comprender toxoide pertussis, hemaglutinina fimbrial, la proteína de 69 kDa y aglutinógenos filamentosos de *Bordetella pertussis* en una proporción en peso de aproximadamente 20:20:5:3, según proporcionan aproximadamente 20 μg de toxoide pertussis, aproximadamente 20 μg de hemaglutinina filamentosa, aproximadamente 5 μg de aglutinógenos fimbriales y aproximadamente 3 μg de proteína de 69 kDa en una sola dosis humana. En otra forma de realización específica, la vacuna puede comprender 40 toxoide pertussis, hemaglutinina filamentosa, la proteína de 69 kDa y aglutinógeno fimbrial de *Bordetella pertussis* en una proporción en peso de 10:5:5:3 según proporcionan aproximadamente 10 μg de toxoide pertussis, aproximadamente 5 μg de hemaglutinina filamentosa, aproximadamente 5 μg de aglutinógeno fimbrial y aproximadamente 3 μg de proteína de 69 kDa en una sola dosis humana. En una forma de realización de la composición inmunogénica proporciona en la presente invención, la vacuna contiene aproximadamente 15 Lfs de toxoide diftérico y aproximadamente 45 5 Lfs de toxoide tetánico.

El poliovirus inactivado utilizado en la composición inmunogénica de la invención comprende generalmente una mezcla de poliovirus inactivos tipos 1, 2 y 3. Esta mezcla de poliovirus inactivos de tipos 1, 2 y 3 puede utilizarse en las composiciones:

50 aproximadamente 20 a aproximadamente 50 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 1;

aproximadamente 5 a aproximadamente 10 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 2;

55 aproximadamente 20 a aproximadamente 50 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 3,

en una sola dosis humana. En una formulación, estas mezclas de tipos de poliovirus inactivado pueden comprender:

60 aproximadamente 40 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 1,

aproximadamente 8 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 2,

aproximadamente 32 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 3 en una sola dosis humana.

65 El componente molecular conjugado de la composición inmunogénica puede comprender un conjugado de toxoide tetánico o toxoide diftérico y polirribosa ribitol fosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b. Esta molécula conjugada puede proporcionar en una forma liofilizada, que se reconstituye para la administración mediante la combinación con los demás componentes. La composición inmunogénica puede contener el conjugado en una cantidad de entre

ES 2 271 969 T3

aproximadamente 5 y aproximadamente 15 μg de PRP conjugado con aproximadamente 15 a aproximadamente 35 μg de toxoide tetánico, en una sola dosis humana. En una formulación, el conjugado se utiliza en una cantidad de aproximadamente 10 μg de PRP conjugado a aproximadamente 20 μg de toxoide tetánico.

5 En dichas formas de realización particulares, las composiciones inmunogénicas proporcionan un perfil de respuesta inmunológica contra cada uno de los antígenos pertussis contenidos en las mismas y el perfil de respuesta proporcionado por los componentes acelulares es sustancialmente equivalente al producido por una vacuna de pertussis de células completas.

10 En una forma de realización preferida de la presente invención, se proporciona una composición de vacuna multivalente, que comprende, por cada dosis de 0,5 ml, 20 μg de toxoide pertussis, 20 μg de hemaglutinina filamentosa, 5 μg de fimbrias 2 y 3, 3 μg de proteína membranal pertactina, 15 Lf de toxoide diftérico, 5 Lf de toxoide tetánico, 40 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 1, 8 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 2, 1,5 μg de fosfato de aluminio.

15 Dicha composición puede comprender además, por cada dosis de 0,5 ml, 10 μg de polisacárido capsular de polirribosa ribitol fosfato purificado (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b unidos covalentemente a 20 μg de toxoide tetánico. Además, dichas composiciones pueden contener, por cada dosis de 0,5 ml, 2-fenoxietanol al 0,6%.

20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para inmunizar un huésped contra múltiples enfermedades, comprendiendo la administración al huésped, que puede ser un ser humano, una cantidad inoefectiva de la composición inmunogénica o vacuna tal como se proporciona en la presente invención.

Entre las ventajas de la presente invención se incluyen una vacuna multivalente que puede proporcionar protección frente a un abanico de enfermedades pediátricas comunes de una manera segura y eficaz. La capacidad de proporcionar una sola vacunación contra múltiples enfermedades sin interferencia entre las respuestas inmunogénicas a los diversos inmunógenos resulta beneficiosa.

La presente invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de la descripción detallada y los Ejemplos siguientes haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 es un esquema de diagrama de flujo de un procedimiento para el aislamiento de una preparación de aglutinógeno de una cepa de *Bordetella*.

35 Descripción detallada

Preparación de aglutinógeno

40 Con referencia a la figura 1, se ilustra un diagrama de flujo de un procedimiento para preparar una preparación de aglutinógeno de una cepa de *Bordetella*. Tal como se observa en la figura 1, se extrae una pasta celular de *Bordetella* que contiene los aglutinógenos, tal como pasta celular de *B. pertussis*, con, por ejemplo, un tampón que contiene urea, tal como fosfato de potasio 10 mM, NaCl 150 mM y urea 4 M, para extraer selectivamente los aglutinógenos de la pasta celular para producir un primer sobrenadante (sp1) que contiene aglutinógenos y un primer precipitado residual (ppt1). El primer sobrenadante (sp1) se separa del primer precipitado residual (ppt1), por ejemplo mediante centrifugación. El precipitado residual (ppt1) se descarta. El sobrenadante clarificado (sp1) puede concentrarse a continuación y diafiltrarse frente a, por ejemplo, fosfato de potasio 10 mM/NaCl 150 mM/Triton X-100 al 0,1% utilizando, por ejemplo, un filtro de membrana de NMWL 100 a 300 kDa.

50 A continuación, se incuba el primer sobrenadante a una temperatura y durante un tiempo para producir un sobrenadante clarificado (sp2) que contiene aglutinógenos y un segundo precipitado descartado (ppt2) que contiene contaminantes no aglutinógeno. Las temperaturas apropiadas se encuentran comprendidas entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 100°C, incluyendo entre aproximadamente 75°C y aproximadamente 85°C, y los tiempos de incubación apropiados se encuentran comprendidos entre aproximadamente 1 y aproximadamente 60 minutos. A continuación, el sobrenadante clarificado se concentra mediante, por ejemplo, la adición de polietilenglicol de peso molecular aproximadamente 8.000 (PEG 8.000) hasta una concentración final de aproximadamente 4,5 \pm 0,2%, agitando suavemente durante un mínimo de aproximadamente 30 minutos, produciendo un tercer precipitado (ppt3) que puede recogerse mediante centrifugación. El sobrenadante restante sp3 se descarta.

60 Este tercer precipitado (ppt3) se extrae con, por ejemplo, un tampón que comprende fosfato de potasio 10 mM/NaCl 150 mM, proporcionando la solución fimbrial cruda que contiene aglutinógeno. Puede añadirse fosfato de potasio 1 M a la solución fimbrial cruda para que sea de aproximadamente 100 mM con respecto al fosfato de potasio. Alternativamente, el sobrenadante clarificado de aglutinógenos fimbriales tratados por calor pueden purificarse sin precipitación mediante cromatografía de filtración en gel utilizando un gel, tal como sefarsa CL6B. Los aglutinógenos fimbriales en la solución cruda se purifican a continuación mediante cromatografía de columna, tal como pasándolos 65 por una columna de sílice PEI, para producir la preparación de aglutinógeno fimbrial en el filtrado.

Este filtrado que contiene aglutinógeno fimbrial puede concentrarse adicionalmente y diafiltrarse frente a, por ejemplo, un tampón que contiene fosfato de potasio 10 mM/NaCl 150 mM utilizando una membrana de NMWL 100 a 300

ES 2 271 969 T3

kDa. La preparación de aglutinógeno puede esterilizarse mediante filtración a través de un filtro de membrana $\leq 0,22$ μM , proporcionando la preparación de aglutinógeno fimbrial purificada final que contiene aglutinógenos fimbriales 2 y 3 sustancialmente libre de aglutinógeno 1. La proporción en peso de Agg2 a Agg3 puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 1,5:1 y aproximadamente 2:1. Las vacunas pueden contener otros inmunógenos purificados de *Bordetella*, incluyendo hemaglutinina filamentosa, la proteína de membrana externa de 69 kDa y toxina pertussis o un toxoide de la misma, incluyendo análogos destoxificados de PT, tal como se describe en, por ejemplo, la ref. 68.

Los otros inmunógenos de *Bordetella*, la toxina pertussis (incluyendo los análogos genéticamente destoxificados de la misma, tal como se describen en, por ejemplo, Klein *et al.*, la patente US n° 5.085.862 asignada al cesionario de la presente patente e incorporada a la presente memoria como referencia), FHA y la proteína de 69 kDa pueden producirse en forma purificada mediante una diversidad de procedimientos, tal como se describe posteriormente.

Purificación de PT

PT puede aislarse del sobrenadante de cultivo de una cepa de *B. pertussis* utilizando procedimientos convencionales. Por ejemplo, puede utilizarse el procedimiento de Sekura *et al.* (ref. 55). PT se aísla en primer lugar adsorbiendo sobrenadante de cultivo sobre una columna que contiene la matriz de gel pigmento-ligando, Affi-Gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). PT se eluye de esta columna con concentración salina elevada, tal como, cloruro de magnesio 0,75 M y, tras eliminar la sal, se pasa a través de una columna de matriz de afinidad de fetuína-sefarosa ligada a bromuro de cianógeno-sefarosa activada. PT se eluye de la columna de fetuína utilizando sal de magnesio 4 M.

Alternativamente, pueden utilizarse los procedimientos de Irons *et al.* (ref. 56). El sobrenadante de cultivo se adsorbe sobre una columna de sefarosa 4B activada con CNBr a la que en primer lugar se une covalentemente haptoglobina. PT se une al adsorbente a pH 6,5 y se eluye de la columna utilizando tampón Tris 0,1 M/NaCl 0,5 M mediante un cambio en un paso hasta pH 10.

Alternativamente, puede utilizarse el procedimiento descrito en la patente US n° 4.705.686 concedida a Scott *et al.* el 10 de noviembre de 1987 e incorporada a la presente memoria como referencia. En el presente procedimiento, se pasan sobrenadantes de cultivo o extractos celulares de *B. pertussis* a través de una columna de una resina de intercambio aniónico de suficiente capacidad para adsorber endotoxina pero que permita el paso o de otra manera la separación respecto a la endotoxina de los antígenos de *Bordetella*.

Alternativamente, puede purificarse PT utilizando cromatografía con perlita, tal como se describe en la patente EP n° 336.736, asignada a los cesionarios de la misma e incorporada a la presente memoria como referencia.

Destoxicación de PT

La PT se destoxifica para eliminar las actividades no deseadas, que podrían causar reacciones secundarias de la vacuna final. Puede utilizarse cualquiera de entre una diversidad de procedimientos convencionales de destoxicación química, tales como el tratamiento con formaldehído, el peróxido de hidrógeno, el tetranitrometano o el glutaraldehído.

Por ejemplo, la PT puede destoxicarse con glutaraldehído utilizando una modificación del procedimiento descrito en Munoz *et al.* (ref. 57). En este procedimiento de destoxicación, se incuba PT purificada en una solución que contiene solución salina tamponada con fosfato 0,01 M. La solución se diluye hasta el 0,05% con glutaraldehído y la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante dos horas, y después se diluye hasta 0,02 M con L-lisina. La mezcla se incuba adicionalmente durante dos horas a temperatura ambiente y se dializa a continuación durante dos días frente a PBS 0,01 M. En una forma de realización particular, puede utilizarse el procedimiento de destoxicación de la patente EP n° 336.736. Brevemente, la PT puede destoxicarse con glutaraldehído de la manera siguiente:

se diluye PT purificada en fosfato de potasio 75 mM a pH 8,0 que contiene cloruro sódico 0,22 M con un volumen igual de glicerol hasta alcanzar concentraciones de proteína de aproximadamente 50 a 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La solución se calienta hasta 37°C y se destoxifica mediante la adición de glutaraldehído hasta una concentración final del 0,5% (p/v). La mezcla se mantiene a 37°C durante 4 horas y después se añade ácido aspártico (1,5 M) hasta una concentración final de 0,25 M. La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora y después se diafiltra con 10 volúmenes de fosfato de potasio 10 mM a pH 8,0 que contienen cloruro sódico 0,15 M y glicerol al 5% para reducir el glicerol y eliminar el glutaraldehído. El toxoide PT se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,2 μM .

Si se utilizan técnicas recombinantes para preparar una molécula de PT mutante que muestre poca o ninguna toxicidad para la utilización como la molécula toxoide, no resulta necesaria la destoxicación química.

Purificación de FHA

Puede purificarse FHA a partir del sobrenadante de cultivo esencialmente tal como describen Cowell *et al.* (ref. 58). Pueden utilizarse promotores del crecimiento, tales como las beta-ciclodextrinas metiladas, para incrementar el rendimiento de FHA en sobrenadantes de cultivo. Se aplica el sobrenadante de cultivo a una columna de hidroxilapatito. Se adsorbe FHA en la columna, pero PT no. La columna se lava extensivamente con Triton X-100 para eliminar la endotoxina. A continuación, se eluye la FHA utilizando NaCl 0,5 M en fosfato sódico 0,1 M y, si resulta necesario, se

ES 2 271 969 T3

pasa a través de una columna de fetuína-sefarosa para eliminar la PT residual. La purificación adicional puede implicar el paso a través de una columna de sefarosa CL-6B.

5 Alternativamente, puede purificarse la FHA utilizando anticuerpos monoclonales contra el antígeno, en los que los anticuerpos se fijan a una columna de afinidad activada con CNBr (ref. 59).

Alternativamente, puede purificarse la FHA mediante la utilización de cromatografía con perlita, tal como se ha descrito en la patente EP n° 336.736 indicada anteriormente.

10 *Purificación de proteína de membrana exterior de 69 kDa (pertactina)*

Puede recuperarse la proteína de membrana externa de 69 kDa (69K o pertactina) a partir de células bacterianas inactivando en primer lugar las células con un agente bacteriostático, tal como el timerosal, tal como se describe en la patente EP publicada n° 484.621 y que se incorpora a la presente memoria como referencia. Las células inactivadas se suspenden en un medio acuoso, tal como PBS (pH 7 a 8) y se someten a extracción repetida a temperatura elevada (45°C a 60°C) con enfriamiento posterior hasta la temperatura ambiente o 4°C. Las extracciones liberan la proteína 69K de las células. El material que contiene la proteína 69K se recoge mediante precipitación y se pasa a través de una columna Affi-gel Blue. La proteína 69K se eluye con una concentración elevada de sales, tal como cloruro de magnesio 0,5 M. Tras la diálisis, se pasa a través de un soporte de cromatoenfoque.

Alternativamente, la proteína de 69 kDa puede purificarse a partir del sobrenadante de cultivo de un cultivo de *B. pertussis*, tal como se describe en la solicitud de patente PCT publicada WO n° 91/15505, en nombre del cesionario de la presente memoria y que se incorpora a la presente memoria como referencia. Este procedimiento resulta preferido debido a que la pertactina se proporciona libre de materiales de cromatografía de pigmento adenilato ciclasa.

Otros procedimientos apropiados de purificación de la proteína de membrana externa de 69 kDa de *B. pertussis* se describen en la patente US n° 5.276.142, concedida a Gotto *et al.* el 4 de enero de 1984, y en la patente US n° 5.101.014, concedida a Burns el 31 de marzo de 1992.

30 *Otros componentes de la invención*

Las vacunas de la invención contienen asimismo inmunógenos no de *Bordetella*, incluyendo el toxoide tetánico, el toxoide diftérico, el poliovirus inactivado (IPV) y, opcionalmente, un conjugado del toxoide diftérico o el toxoide tetánico y un polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. Entre otros componentes potenciales de las vacunas multicomponente se incluyen las proteínas de la membrana externa de *Haemophilus*, antígeno de superficie de la hepatitis B, parotiditis, sarampión y rubéola.

Los conjugados del toxoide tetánico o del toxoide diftérico y del polisacárido capsular de Hib pueden formarse mediante el aislamiento de la polirribosa ribitol fosfato (PRP) aislada de *H. influenzae* tipo b, derivatizando la PRP para proporcionar una dihidrazida de ácido adípico y conjugándola covalentemente a toxoide tetánico o a toxoide diftérico para proporcionar conjugados PRP-T o PRP-D, respectivamente.

Cada uno de los antígenos se adsorbe individualmente a un adyuvante, tal como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio, denominados colectivamente alumbre, para permitir la producción conveniente y rápida de vacunas que contienen cantidades relativas seleccionadas de estos antígenos en las vacunas que se proporcionan en la presente invención.

Formulaciones seleccionadas de vacuna multivalente

50 En las formas de realización seleccionadas, la invención proporciona vacunas con las características siguientes (los µg de proteínas utilizadas en la presente invención se basan en resultados de ensayo de Kjedahl llevados a cabo en concentrados purificados y se expresan como µg de nitrógeno proteico), todas las cuales pueden administrarse mediante inyección intramuscular:

55 (a) $CP_{20/50/5/3}$ DT-mIPV (HÍBRIDA)

Una formulación comprende una combinación de vacuna pertussis componente (CP) combinada con toxoides diftéricos (DI) y tetánicos (T) y poliovirus inactivado (mIPV) y se denomina $CP_{20/20/5/3}$ DT-mIPV (HÍBRIDA). El poliovirus cultivado en células MRC-5 se designan mIPV, mientras que los poliovirus cultivados en células Vero se denominan IPV o vIPV. En las formulaciones puede utilizarse de manera intercambiable cualquiera de los materiales de poliovirus inactivado.

65 Cada 0,5 ml de dosis humana de $CP_{20/20/5/3}$ DT-mIPV (HÍBRIDA) se formuló para que contuviese aproximadamente:

ES 2 271 969 T3

- 20 μg de toxoide pertussis (PT)
- 20 μg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
- 5 μg de aglutinógenos fimbriales 2 y 3 (FIM)
- 3 μg de proteína pertactina de membrana externa (69 kDa)
- 15 Lf de toxoide diftérico
- 5 Lf de toxoide tetánico
- 40 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 1
- 8 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 2
- 32 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 3
- 1,5 mg de fosfato de aluminio
- al 0,6% 2-fenoxietanol, como conservante

(b) $CP_{20/20/5/3}DT\text{-}mIPV$ (HÍBRIDA) + PRP-T

Otra formulación comprende una combinación de vacuna de componente pertussis (CP) combinada con toxoides diftérico (D) y tetánico (T) y poliovirus inactivado (mIPV) denominada $CP_{20/20/5/3}DT\text{-}mIPV$ (HÍBRIDA) y se utiliza para reconstituir PRP-T liofilizada. La composición resultante contiene, por cada dosis de 0,5 ml, aproximadamente:

- 20 μg de toxoide pertussis (PT)
- 20 μg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
- 5 μg de aglutinógenos fimbriales 2 y 3 (FIM)
- 3 μg de proteína pertactina de membrana externa (69 kDa)
- 15 Lf de toxoide diftérico
- 5 Lf de toxoide tetánico

10 μg de polisacárido capsular polirribosa ribitol fosfato purificado (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b covalentemente unido a 20 μg de toxoide tetánico.

- | | |
|----------------------|---------------------------|
| Poliovirus de tipo 1 | 40 unidades de antígeno D |
| Poliovirus de tipo 2 | 8 unidades de antígeno D |
| Poliovirus de tipo 3 | 32 unidades de antígeno D |

- | | |
|----------------|---------------------|
| 1,5 mg al 0,6% | Fosfato de aluminio |
| | 2-fenoxietanol |

(c) $CP_{20/20/5/3}DT\text{-}PRP\text{-}T\text{-}IPV$ (HÍBRIDA)

Una formulación adicional comprende una combinación de vacuna de componente pertussis (CP) combinada con toxoides diftérico (D) y tetánico (T), poliovirus inactivado (mIPV) y PRP-T y se denomina $CP_{20/20/5/3}DT\text{-}PRP\text{-}T\text{-}IPV$ (HÍBRIDA). Cada 0,5 ml de dosis humana de esta composición contienen aproximadamente:

- 20 μg de toxoide pertussis (PT)
- 20 μg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
- 5 μg de aglutinógenos fimbriales 2 y 3 (FIM)
- 3 μg de proteína pertactina de membrana externa (69 kDa)
- 15 Lf de toxoide diftérico
- 5 Lf de toxoide tetánico

10 μg de polisacárido capsular ribosa ribitol fosfato purificado (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b unido covalentemente a 20 μg de toxoide tetánico.

- | | |
|----------------------|---------------------------|
| Poliovirus de tipo 1 | 40 unidades de antígeno D |
| Poliovirus de tipo 2 | 8 unidades de antígeno D |
| Poliovirus de tipo 3 | 32 unidades de antígeno D |

- | | |
|----------------|---------------------|
| 1,5 mg al 0,6% | Fosfato de aluminio |
| | 2-fenoxietanol |

Ensayos clínicos(a) *Vacuna de pertussis con componente DTP*

5 Se llevaron a cabo varios ensayos clínicos en seres humanos, tales como los descritos en la presente memoria, con el fin de establecer la seguridad, no reactogenicidad y utilidad de las vacunas de componente pertussis que contenían aglutinógenos fimbriales preparadas tal como se describe en la presente memoria, para la protección frente a pertussis. En particular, se obtuvieron las respuestas inmunológicas contra cada uno de los antígenos contenidos en las vacunas (tal como se muestra, por ejemplo, en la Tabla 3 posteriormente). Se analizó una vacuna multivalente particular de
10 pertussis CP_{10/5/5/3}DT en un ensayo clínico multicentro de grandes dimensiones controlado con placebo doblemente aleatorizado en una población humana de riesgo para estimar la eficacia de la vacuna contra la pertussis típica.

La definición de caso para la enfermedad pertussis típica era:

15 Veintiún días o más de tos espasmódica,

y

20 *B. pertussis* confirmada en cultivo,

o

evidencia serológica de infección específica por *Bordetella* indicada por un incremento del 100% de anticuerpo IgG o IgA en ELISA contra FHA o PT en sueros apareados,

25

o

en caso de carecer de datos serológicos,

30 el niño de estudio ha estado en contacto en su domicilio con un caso confirmado en cultivo de *B. pertussis* con aparición de tos dentro de los 28 días anteriores o posteriores a la aparición de tos en el niño de estudio.

Los resultados de este estudio demostraron que CP_{10/5/5/3}DT presentaba una eficacia aproximada del 85% en la prevención de pertussis según se define en la definición de caso para la enfermedad pertussis típica tal como se ha descrito anteriormente. En el mismo estudio, una vacuna acelular de dos componentes de pertussis que contenía sólo PT y FHA presentaba una eficacia aproximada del 58% (PT₂₅.FHA₂₅.DT) y una vacuna de pertussis de células completas (DTP) presentaba una eficacia aproximada del 48% (ver la Tabla 4, posteriormente). Además, la vacuna CP_{10/5/5/3}DT previno la pertussis moderada, definida como una tos de por lo menos un día de duración con una eficacia de aproximadamente el 77%. En particular, el perfil de respuesta inmunológica obtenido era sustancialmente el mismo que el obtenido tras la inmunización con vacunas de pertussis de células completas, que se informa que resultan
40 altamente eficaces contra la pertussis.

(b) *Vacuna multivalente DPT-PRP-T-IPV*

45 (I) Se comparó la seguridad y la inmunogenicidad de las vacunas de componente pertussis en combinación con toxoide diftérico y toxoide tetánico adsorbidos, la vacuna conjugada con toxoide tetánico de *Haemophilus influenzae* tipo b y la vacuna de poliomielitis inactivada cultivada en células Vero (CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-IPV), con la vacuna de pertussis de células completas (a) en combinación con toxoides diftérico y tetánico adsorbidos y vacuna de poliomielitis inactivada, (b) en combinación con toxoides diftérico y tetánico adsorbidos y vacuna de poliomielitis inactivada
50 cultivada en células MRC-5 (DPT-polio adsorbida) utilizada para reconstituir vacuna conjugada con toxoide tetánico de *Haemophilus influenzae* tipo b liofilizada (PENTATM), o (c) vacuna de componente pertussis en combinación con toxoides diftéricos y tetánicos adsorbidos, vacuna conjugada con toxoide tetánico de *Haemophilus influenzae* tipo b y vacuna de poliomielitis inactivada cultivada en células MRC-5 (CP_{20/20/5/3}DT-mIPV) administradas separadamente o utilizadas para reconstituir vacuna conjugada con toxoide tetánico de *Haemophilus influenzae* tipo b liofilizada (PRP-T) en niños de 2, 4, 6 y 18 meses de edad.
55

Este ensayo controlado y aleatorizado incluía 897 bebés de dos meses de edad que recibieron una de entre ocho brazos de vacuna diferentes: CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-IPV (líquida); CP_{20/20/5/3}DT administrada concurrentemente pero en un sitio diferente de PRP-T; o la vacuna de control, DPT-Polio de células completas utilizada para reconstituir PRP-T
60 (PENTA TM).

Todas las vacunas de estudio fueron bien toleradas. No se observaron diferencias significativas de tasas de reacción entre los dos tipos de combinaciones de pertussis recombinante. Los niños que habían recibido la vacuna combinada CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizada para reconstituir PRP-T presentaron tasas ligeramente más elevadas de reacciones locales en comparación con los mismos productos administrados en sitios diferentes. Todas las combinaciones de componente pertussis presentaron tasas consistentemente más reducidas de reacciones locales y sistémicas que la combinación de células completas. Las diferencias de velocidades de reacción entre las vacunas de componente pertussis y de células completas resultaron más evidentes en las 24 horas inmediatamente posteriores a la vacunación.
65

ES 2 271 969 T3

Ambas combinaciones de componente pertussis produjeron respuestas excelentes a todos los antígenos. En todas las situaciones, las respuestas de PT de pertussis, de FHA y de pertactina fueron superiores a las respuestas observadas a combinaciones de células completas. No se observaron diferencias significativas entre las combinaciones de componente y de células completas. No se observaron diferencias significativas entre las formulaciones de componente y de células completas para anti-PRP, difteria y polios 1 y 2. Las dos formulaciones de componente pertussis produjeron respuestas tetánicas más elevadas que PENTA™. Ambas formulaciones de componente produjeron respuestas serológicas similares frente a todos los antígenos excepto polio 3, para la que CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizada para reconstituir PRP-T produjo respuestas más elevadas que CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-IPV. El procedimiento de administración no afectó las respuestas serológicas a ninguno de los antígenos excepto el tétanos. En los grupos tanto combinados como separados, el 100% de los niños resultó protegido (>0,01 EU/ml) frente al tétanos tras 3 dosis de la vacuna.

Más importante, todos los grupos de vacuna presentaron buenas respuestas a PRP-T, alcanzando el 98,3% de los niños niveles >0,15 µg/ml y más del 86,1% de los niños alcanzó niveles >1,0 µg/ml. Estos datos son comparables a los observados en estudios anteriores en los que se utilizaron vacunas de pertussis de células completas con PRP-T.

Se muestran las respuestas serológicas obtenidas y descritas anteriormente en las Tablas 5 a 7 (H=híbrida).

(II) Se comparó la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna de componente pertussis combinada con toxoides diftéricos y tetánicos y la vacuna de poliomiелitis inactivada cultivada en células MRC-5 (CP_{20/20/5/3}DT-mIPV) administradas separadamente o utilizadas para reconstituir vacuna conjugada con toxoide tetánico de *Haemophilus influenzae* tipo b liofilizada (PRP-T), con vacuna de pertussis de células completas combinada con toxoides diftéricos y tetánicos adsorbidos y vacuna de poliomiелitis inactivada cultivada en células MRC-5 (DTP-polio adsorbida) utilizada para reconstituir vacuna conjugada con toxoide tetánico de *Haemophilus influenzae* tipo b (PENTA™) en niños de 18 a 19 meses de edad.

Este estudio de cinco brazos incluyó un brazo de control de PENTA™ de células completas y CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T. El quinto grupo recibió CP_{20/20/5/3}DT-mIPV concurrentemente pero en un sitio diferente de PRP-T. Cuatrocientos ochenta y nueve sujetos recibieron vacuna a los 18 ó 19 meses de edad de los que 466 (el 95%) completó el estudio según el protocolo. El CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T era significativamente menos reactogénico que PENTA™, particularmente en las primeras 24 horas de la vacunación. El producto reconstituido presentaba tasas ligeramente más elevadas de reacciones locales que el producto administrado separadamente.

PENTA™ produjo respuestas polio 1 más elevadas que CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizada para reconstituir PRP-T. No se observaron diferencias significativas para anti-PRP, difteria, aglutinina de pertussis, fimbrias, polio 2 o polio 3. El CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T produjo respuestas serológicas de PT de pertussis, FHA y pertactina significativamente más elevadas. El CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T produjo respuestas serológicas consistentes a todos los antígenos sometidos a ensayo. No se observaron diferencias significativas entre CP_{20/20/5/3}DT-mIPV administrados separadamente frente a los utilizados para reconstituir PRP-T excepto en la comparación con la antitoxina tetánica (6,78 frente a 4,91 EU/ml).

Este estudio demostró que CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T produjo respuestas serológicas consistentes en tres lotes y era más inmunogénico que PENTA™ frente a las respuestas a Pertussis. CP_{20/20/5/3}DT-mIPV también produjo tasas significativamente menores de reacciones locales y sistémicas que PENTA™.

(III) Se comparó la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna de componente pertussis combinada con toxoides diftéricos y tetánicos adsorbidos y vacuna de poliomiелitis inactivado cultivado en células MRC-5 (CP_{20/20/5/3}DT-mIPV) con vacuna de pertussis de células completas en combinación con toxoides diftérico y tetánico adsorbidos y vacuna de poliomiелitis inactivada cultivada en células MRC-5 (DTP-polio adsorbida) en niños de 4 a 6 años de edad.

Se asignaron aleatoriamente ciento sesenta y cuatro sujetos en una proporción de 4 a 1 a recibir CP_{20/20/5/3}DT-mIPV (n=131) o DTP-polio (n=33). No se produjeron sucesos adversos significativos o graves en el estudio. CP_{20/20/5/3}DT-mIPV presentó tasas consistentemente más reducidas de reacciones tanto locales como sistémicas, particularmente en el periodo de 0 a 24 horas. Las reacciones locales fueron habituales en ambos grupos, presentando el 97% de DTP-polio y el 76,9% de CP_{20/20/5/3}DT-mIPV alguna reacción local en el periodo de 0 a 24 horas. Las reacciones locales con CP_{20/20/5/3}DT-mIPV habitualmente fueron leves o moderadas. En contraste, más de la mitad de los receptores de DTP-polio presentaron reacciones locales clasificadas como severas. La sensibilidad en el sitio de inyección habitualmente desapareció a las 72 horas, aunque el enrojecimiento o la hinchazón tendieron a persistir bien entrado el periodo de 24 a 72 horas.

Las reacciones sistémicas en el periodo de 0 a 24 horas fueron menos comunes en los receptores de CP_{20/20/5/3}DT-mIPV (38,5%) que en los receptores de DTP-polio (90,9%). Las reacciones sistémicas en el periodo de 24 a 72 horas fueron poco comunes en ambos grupos.

Las respuestas a la difteria, tétanos, polio 2 y 3 fueron comparables con las dos vacunas. Los receptores de DTP-polio presentaron una respuesta a polio 1 significativamente más elevada (15.462) que los receptores de CP_{20/20/5/3}DT-mIPV (10.903). Todos los sujetos presentaron respuestas excelentes y se consideraron protegidos frente a las enferme-

ES 2 271 969 T3

dades respectivas. Las respuestas serológicas a todos los antígenos pertussis fueron significativamente más elevadas en los receptores de CP_{20/20/5/3}DT-mIPV.

5 (IV) Se comparó la seguridad y la inmunogenicidad de la vacuna de componente pertussis en combinación con los toxoides diftérico y tetánico adsorbidos, la vacuna conjugada con toxoide tetánico de *Haemophilus influenzae* tipo b y la vacuna de poliomielitis inactivada cultivada en células MRC-5 (CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-mIPV) con la vacuna de pertussis de células completas en combinación con toxoides diftérico y tetánico adsorbidos y vacuna de poliomielitis inactivada cultivada en células MRC-5 (DPT-polio adsorbida) utilizada para reconstituir vacuna conjugada con toxoide tetánico de *Haemophilus influenzae* tipo b liofilizada (PENTATM) o vacuna de componente pertussis en combinación con toxoides diftérico y tetánico adsorbidos y vacuna de poliomielitis inactivada cultivada en células MRC-5 (CP_{20/20/5/3}DT-mIPV) utilizada para reconstituir vacuna conjugada con toxoide tetánico de *Haemophilus influenzae* tipo b liofilizada (PRP-T) en niños de 18 a 19 meses de edad.

15 El propósito de este estudio aleatorizado y controlado de ciego único de tres brazos era evaluar la seguridad y la inmunogenicidad de las dos nuevas combinaciones de pertussis acelular, CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-IPV y CP_{20/20/5/3}DT-mIPV, utilizados para reconstituir PRP-T, con PENTATM (DPT-polio pertussis de células completas utilizado para reconstituir PRP-T) en niños de 18 a 19 meses de edad. Participó un total de 99 niños; 33 en cada uno de los tres grupos de vacuna, de los que 97 (el 98%) completó el estudio según el protocolo.

20 No se observaron reacciones graves en este estudio. Los receptores de PENTATM era significativamente más probable que experimentasen reacciones locales y sistémicas moderadas o severas que los receptores de las otras dos vacunas. Las diferencias fueron más pronunciadas a las 24 horas y alcanzaron la significancia estadística para fiebre, enrojecimiento, hinchazón, sensibilidad, irritabilidad, reducción de la actividad y reducción de la ingesta. Las reacciones tendieron a ser leves en niños que habían recibido combinaciones de componente pertussis. No se observaron diferencias significativas en las tasas de reacción en las dos formulaciones de componente pertussis, aunque se observó irritabilidad más frecuentemente a las 24 horas en los que recibieron CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizado para reconstituir PRP-T frente a CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-IPV (18% frente al 3%).

30 Las respuestas serológicas fueron satisfactorias, alcanzando el 100% de los participantes niveles considerados protectores para la antitoxina de la difteria ($\geq 0,01$ U/ml), la antitoxina del tétanos ($\geq 0,01$ U/ml) y anti-PRP ($\geq 1,0$ μ g/ml). Se observaron anticuerpos neutralizantes detectables en polio tipos 1, 2 y 3 en todos los participantes tras la inmunización.

35 Las respuestas a la difteria fueron superiores en los receptores de PENTATM, reflejando el mayor contenido de antígenos de esta vacuna (25 Lf frente a 15 Lf).

40 Los anticuerpos de pertussis fueron consistentemente más elevados en las combinaciones de pertussis de dos componentes frente a PENTATM, alcanzando la significancia estadística para los GMT de anti-PT, anti-FHA y anti-pertactina. Los anticuerpos antifimbriales y aglutinantes de pertussis también fueron más elevados en los receptores de componente pertussis, aunque las diferencias no alcanzaron la significancia estadística.

45 En resumen, este estudio demostró que las dos combinaciones acelulares de pertussis, CP_{20/20/5/3}DP-mIPV utilizadas para reconstituir PFP-T y CP_{20/20/5/3}DT-PRP-T-IPV, eran comparables y produjeron tasas de reacción satisfactoriamente reducidas y respuestas serológicas elevadas cuando se administraron como refuerzo a niños de 18 a 19 meses de edad.

50 (V) La seguridad y la inmunogenicidad de vacuna de componente pertussis en combinación con toxoide diftérico y tetánico adsorbido (CP_{20/20/5/3}DT) sola o en combinación con uno o más poliovirus inactivados, un mIPV cultivado en células MRC-5 y el otro vIPV cultivado en células Vero, o vacuna oral de poliomielitis (OPV) en niños de 17 a 19 meses de edad.

55 Este estudio de cinco brazos se diseñó para examinar la interacción entre CP_{20/20/5/3}DT y dos IPV (cultivados en células Vero o en célula MRC-5). Ambos IPV se combinaron como producto líquido único con CP_{20/20/5/3}DT-mIPV y CP_{20/20/5/3}DT-vIPV o se administraron concurrentemente pero en un sitio de inyección diferente (CP_{20/20/5/3}DT+mIPV y CP_{20/20/5/3}DT+vIPV). Un quinto grupo de estudio recibió CP_{20/20/5/3}DT y OPV concurrentemente. Todos los sujetos recibieron PRP-T en la extracción sanguínea posterior a la inmunización. En este estudio no se evaluaron las respuestas anti-PRP.

60

65

ES 2 271 969 T3

Diseño del estudio

NÚMERO	VISITA 1 (17 A 19 MESES)	VISITA 2 (+1 MES)
85	1. CP _{20/20/5/3} DT-mIPV (1 inyección)	PRP-T
85	2. CP _{20/20/5/3} DT-mIPV (2 inyecciones)	PRP-T
85	3. CP _{20/20/5/3} DT-vIPV (1 inyección)	PRP-T
85	4. CP _{20/20/5/3} DT-vIPV (2 inyecciones)	PRP-T
85	5. CP _{20/20/5/3} DT-OPV (1 inyección)	PRP-T

En general, no se observaron diferencias en la tasa de reacciones adversas informadas tras las vacunas de polio-mielitis inactivada derivada de células MRC-5 o de células Vero, administrando la vacuna como inyección separada o combinada con la vacuna CP_{20/20/5/3}DT (HÍBRIDA).

No se observaron diferencias significativas entre grupos para PT, FHA y pertactina. Las respuestas en niños que recibieron CP_{20/20/5/3}DT (HÍBRIDA) y OPV fueron ligeramente más elevadas, aunque no significativamente, que en niños que recibieron CP_{20/20/5/3}DT (HÍBRIDA) e IPV procedente de células Vero contra FIM, aglutinina de pertussis, difteria y tétanos. Las respuestas contra polio fueron generalmente comparables o más elevadas en los niños que habían recibido una vacuna IPV frente a una OPV. La totalidad de los individuos a excepción de uno presentó niveles de aglutinina de pertussis >1:64. La totalidad de los individuos a excepción de uno alcanzó niveles de antitoxina diftérica ≥ 0,1 U/ml y la totalidad alcanzó niveles de antitoxina tetánica ≥ 0,1 EU/ml.

Los resultados de este estudio demostraron que CP_{20/20/5/3}DT (HÍBRIDA) en combinación con IPV (de células MRC-5 o de células Vero) es segura e inmunogénica en niños de 17 a 19 meses de edad. Las vacunas de combinación fueron por lo menos tan inmunogénicas como la vacuna administrada como inyecciones separadas, y en algunos casos más inmunogénica. La combinación de la vacuna como inyección única no se asoció a un incremento significativo de las reacciones adversas locales. No se detectaron diferencias sustanciales en las reacciones adversas o respuesta inmunológica a las dos preparaciones de IPV, como inyecciones separadas ni como productos combinados. La inclusión de IPV no incrementó la tasa de las reacciones adversas en comparación con CP_{20/20/5/3}DT (HÍBRIDA) administrado solo (es decir, con OPV).

Los resultados serológicos obtenidos en el estudio se resumen en la Tabla 8 (H=híbrida).

(VI) (a título comparativo) Se determinaron la seguridad y la inmunogenicidad de las vacunas de componente pertussis en combinación con los toxoides diftérico y tetánico adsorbidos (CP_{20/20/5/3} DT y CP_{10/5/5/3} DT) solos o en combinación con *Haemophilus influenzae* tipo b en niños de 17 a 19 meses de edad.

El estudio de seis brazos se diseñó para examinar la interacción entre las formulaciones de componente pertussis tanto clásica (CP_{10/5/5/3}DT) como Híbrida (CP_{20/20/5/3}DT) y la vacuna conjugada de *Haemophilus influenzae* tipo B (PRP-T) en niños de 18 a 19 meses de edad.

Se utilizaron tres programas, en los que: (a) cada una de las vacunas de componente pertussis se utilizó para reconstituir PRP-T, (b) se administraron concurrentemente pero en un sitio separado de PRP-T, o (c) se administró PRP-T 1 mes después de la vacuna de componente pertussis. Todos los niños recibieron OPV en la primera visita y fueron vacunados con la misma vacuna de componente pertussis a los 2, 4 y 6 meses de edad. Todos los niños habían participado anteriormente en el estudio de seguridad de grandes dimensiones de estas dos formulaciones de vacuna.

Se incluyó un total de 545 sujetos en el estudio, de los que 542 (el 99%) completó el estudio.

ES 2 271 969 T3

Diseño del estudio

NÚMERO	VISITA 1 (17 a 19 meses)		VISITA 2(+1 mes)	VISITA 3 (+2 meses)
154	1. CP _{20/20/5/3} DT utilizada para reconstituir PRP-T	SANGRE + OPV	Sangre	-
152	CP _{20/20/5/3} DT administrada concurrentemente con OPV PRP-T		Sangre	-
159	CP _{20/20/5/3} DT		PRP-T	Sangre
27	CP _{10/5/5/3} DT utilizada para reconstituir PRP-T	SANGRE + OPV	Sangre	-
29	CP _{10/5/5/3} DT administrada concurrentemente con PRP-T		Sangre	-
21	CP _{10/5/5/3} DT		PRP-T	Sangre

Las respuestas serológicas generalmente fueron más elevadas contra la mayoría de antígenos cuando se administró una vacuna de combinación de componente pertussis y PRP-T el mismo día, en comparación con días separados (ver la Tabla 9).

Resulta importante que las respuestas anti-PRP no se redujeron al administrar PRP-T separadamente frente a combinado con una vacuna de combinación de componente pertussis el mismo día.

Los GMT posteriores a la inmunización en niños administrados las vacunas en días separados fueron significativamente inferiores. Las diferencias en las respuestas anti-PRP entre las inyecciones combinada y separada se observaron cuando los sujetos se estratificaron según formulación de vacuna de componente pertussis. Los receptores de CP_{20/20/5/3}DT (HÍBRIDA) mostraron niveles anti-PRP más bajos cuando la vacuna se administró en combinación y no separadamente. Estas diferencias no se observaron en los receptores de CP_{10/5/5/3}DT, y las diferencias desaparecieron tras combinar los grupos. Todos los participantes alcanzaron niveles anti-PRP $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ y más del 98% de cada grupo presentó un nivel $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$. Sólo cuatro (0,7%) de los participantes en el estudio no alcanzó este nivel; tres en las inyecciones separadas en días separados y uno en el grupo de inyección combinada. Más del 82% de cada grupo superó los títulos de $10 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-PRP.

De las reacciones locales inducidas, sólo se informó más frecuentemente de sensibilidad en el grupo combinado (27,8%) en comparación con el grupo de vacunación en días separados (16,7%). Esta tasa no fue diferente de la observada en el grupo que recibió vacunas el mismo día en inyecciones separadas (24,2%).

En global, se informó de una reacción sistémica con una frecuencia similar (60 a 62,1%) en los participantes de cada uno de los grupos de vacuna. Se informó de fiebre en aproximadamente un tercio de los participantes. Sólo se informó de irritabilidad con más frecuencia en el grupo de inyección combinada (33,3%) en comparación con los grupos de inyecciones separadas (22,0%) o en días separados (22,8%).

Resumiendo los resultados de este ensayo, la administración concurrente de CP_{10/5/5/3}DT o CP_{20/20/5/3}DT y PRP-T el mismo día no interfirió con las respuestas NTI-PRP sino que podría haberlas incrementado. Las respuestas serológicas a otros antígenos también fueron excelentes. El tétanos fue el único antígeno afectado al mezclar las dos vacunas, pero todos los niños presentaron niveles elevados de protección.

Para los últimos ensayos clínicos, se preparó CP_{10/5/5/3}DT-IPV cultivado en células MRC5 para la reconstitución con ActHib (PRP-T) y A5I (CP_{10/5/5/3}DT-PRP-T-IPV cultivado en células Vero $3 \mu\text{g/ml}$). Los antígenos de componente pertussis se adsorbieron individualmente en fosfato de aluminio 3 mg/ml en ausencia de conservante, a este respecto,

PT se introdujo en fosfato de potasio 10 mM , NaCl $0,15 \text{ M}$, glicerol al 5%; FHA se introdujo en fosfato de potasio 10 mM , NaCl $0,5 \text{ M}$; 69K se introdujo en fosfato de potasio 10 mM , NaCl $0,15 \text{ M}$, y las fimbrias se introdujeron en fosfato de potasio 10 mM , NaCl $0,15 \text{ M}$. El antígeno D se adsorbió en fosfato de aluminio ($6,25 \text{ mg/ml}$) a una concentración de 300 Lf/ml . Se añadió 2-fenoxietanol como conservante hasta el 0,6%. El antígeno T se adsorbió a fosfato de aluminio ($6,25 \text{ mg/ml}$) a una concentración de 300 Lf/ml . Se añadió 2-fenoxietanol hasta el 0,6%.

ES 2 271 969 T3

Los antígenos de componente pertussis adsorbidos se combinaron con antígeno D y con antígeno T adsorbidos a una concentración de 3,65 dosis/ml o 55% del volumen final. El contenido de 2-fenoxietanol era del 0,6%. Previamente a la combinación con mIPV o v-IPV/PRP-T, se confirmó la esterilidad y los contenidos de aluminio y de 2-fenoxietanol. Para 5 ml, se añadieron m-IPV y 2-fenoxietanol y se diluyeron hasta obtener la concentración final. Para A5I, se añadieron v-IPV, PRP-T y 2-fenoxietanol y se diluyeron hasta obtener la concentración final.

Como resumen de los resultados de los ensayos clínicos con vacunas multivalentes, puede observarse que la CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizada para reconstituir PRP-T produjo respuestas serológicas comparables frente a la difteria, tétanos y polios 1, 2 y 3 en comparación con PENTA™ (que contiene vacuna de pertussis de células completas). Las respuestas anti-PRP fueron comparables o más elevadas que las observadas con PENTA™, tanto a las dosis infantiles como a las de refuerzo. Las respuestas a los tétanos eran más bajas que la CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizada para reconstituir PRP-T en comparación con CP_{20/20/5/3}DT-mIPV administrada separadamente de PRP-T, aunque esta reducción no fue clínicamente relevante. En concordancia con otros estudios, la vacuna de células completas produjeron respuestas de fimbrias y de aglutininas comparables o más elevadas que las de la vacuna de componente pertussis; sin embargo, la vacuna de células completas utilizada es conocido que contiene un componente fimbrial altamente inmunogénico. Todas las demás respuestas a pertussis fueron consistentemente más elevadas con la CP_{20/20/5/3}DT-mIPV utilizada para reconstituir PRP-T que con PENTA™. De esta manera, la presente invención proporciona composiciones inmunogénicas multivalentes en las que las respuestas inmunológicas contra los antígenos no se ven reducidas ni alteradas por los demás componentes o por su inclusión en la vacuna multivalente. Las respuestas inmunológicas reducidas en ocasiones se denominan interferencia.

Preparación y utilización de las vacunas

De esta manera, pueden prepararse composiciones, adecuadas para su utilización como vacunas, a partir de inmunógenos tales como los dados a conocer en la presente memoria. La vacuna induce una respuesta inmunológica en un sujeto que produce anticuerpos.

Las composiciones inmunogénicas, incluyendo las vacunas, pueden prepararse como inyectables, como soluciones líquidas o como emulsiones. Los inmunógenos pueden mezclarse con excipientes farmacéuticamente aceptables que son compatibles con los inmunógenos. Entre estos excipientes pueden incluirse agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. Las composiciones inmunogénicas y vacunas pueden contener además sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, o adyuvantes para incrementar la efectividad de los mismos. Las composiciones inmunogénicas y vacunas se administran de una manera compatible con la formulación de dosis, y en una cantidad que resulte terapéuticamente efectiva, inmunogénica y protectora. La cantidad que debe administrarse depende del sujeto a tratar, incluyendo, por ejemplo, la capacidad del sistema inmunológico del individuo de sintetizar anticuerpos y, si resulta necesario, para producir una respuesta inmunológica mediada por células. Las cantidades precisas de ingrediente activo requerido que deben administrarse dependen del criterio médico. Sin embargo, los intervalos de dosis adecuados son fácilmente determinables por un experto en la materia y pueden ser del orden de microgramos de los inmunógenos. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo también son variables, pero pueden incluir una administración inicial seguido de administraciones posteriores. La dosis también puede depender de la vía de administración y variará según el tamaño del huésped.

La concentración de los inmunógenos en una composición inmunogénica de acuerdo con la invención en general es de aproximadamente 1 a aproximadamente 95%. La inmunogenicidad puede mejorarse significativamente si los antígenos se coadministran con adyuvantes, utilizados comúnmente en forma de solución entre el 0,005 y el 0,5 por ciento en solución salina tamponada con fosfato. Los adyuvantes incrementan la inmunogenicidad del antígeno pero no son necesariamente inmunogénicos ellos mismos. Los adyuvantes pueden actuar reteniendo el antígeno localmente cerca del sitio de administración, produciendo un efecto de depósito que facilita una liberación sostenida lenta del antígeno a las células del sistema inmunológico. Los adyuvantes también pueden atraer células del sistema inmunológico a un depósito de antígeno y estimular que dichas células induzcan respuestas inmunológicas.

Los agentes inmunoestimulantes o adyuvantes se han utilizado durante muchos años para mejorar las repuestas inmunológicas del huésped frente a, por ejemplo, vacunas. Los adyuvantes intrínsecos, tales como los lipopolisacáridos, normalmente son los componentes de las bacterias muertas o atenuadas utilizadas como vacunas. Los adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que típicamente se encuentran unidos no covalentemente a antígenos y se formulan para incrementar las respuestas inmunológicas del huésped. De esta manera, se han identificado adyuvantes que potencian la respuesta inmunológica a antígenos administrados parenteralmente. Sin embargo, algunos de estos adyuvantes son tóxicos, y pueden causar efectos secundarios no deseables, haciendo que resulten inadecuados para la utilización en seres humanos y en muchos animales. En efecto, sólo el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio (a los que se hace referencia colectivamente habitualmente como alumbre) se utilizan rutinariamente como adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias. La eficacia del alumbre en el incremento de las respuestas de anticuerpos contra los toxoides diftéricos y tetánico ha sido bien establecida.

Un amplio abanico de adyuvantes extrínsecos puede provocar potentes respuestas inmunológicas contra antígenos. Entre estos se incluyen las saponinas acopladas a antígenos de proteína membranal (complejos estimulantes inmunológicos), polímeros Pluronic con aceite mineral, micobacterias muertas en aceite mineral, adyuvante completo de

ES 2 271 969 T3

Freund, productos bacterianos, tales como dipéptido muramilo (MDP) y lipopolisacárido (LPS), así como lípido A y liposomas.

Con el fin de inducir eficientemente las respuestas inmunológicas humorales (HIR) y la inmunidad mediada por células (CMI), los inmunógenos con frecuencia se emulsionan en adyuvantes. Muchos adyuvantes son tóxicos, e inducen granulomas, inflamaciones agudas y crónicas (adyuvante completo de Freund, FCA), citólisis (saponinas y polímeros Pluronic), y pirogenicidad, artritis y uveítis anterior (LPS y MDP). Aunque FCA es un excelente adyuvante y se utiliza ampliamente en investigación, no se encuentra autorizado para su utilización en vacunas humanas o veterinarias debido a su toxicidad.

Entre las características deseables de los adyuvantes ideales se incluyen:

(1) falta de toxicidad;

(2) capacidad de estimular una respuesta inmunológica de larga duración;

(3) simplicidad de fabricación y estabilidad en el almacenamiento de largo plazo;

(4) capacidad de inducir tanto CMI como HIR contra antígenos administrados por diversas vías;

(5) sinergia con otros adyuvantes;

(6) capacidad de interactuar selectivamente con poblaciones de células presentadoras de antígenos (APC);

(7) capacidad de inducir específicamente respuestas inmunológicas apropiadas específicas de células T_H1 o T_H2 ; y

(8) capacidad de incrementar selectivamente los niveles del isotipo de anticuerpo apropiado (por ejemplo de IgA) contra los antígenos.

La patente US nº 4.855.283 concedida a Lockhoff *et al.* el 8 de agosto de 1989, que se incorpora a la presente memoria como referencia, enseña análogos glucolípidos, incluyendo N-glucosilamidas, N-glucosilureas y N-glucosilcarbamatos, cada uno de los cuales se sustituye en el residuo azúcar por un aminoácido, tal como en inmunomoduladores o adyuvantes. De esta manera, Lockhoff *et al.* (patente US nº 4.855.283 y ref. 60) han informado de que los análogos N-glucolípidos que muestran similitudes estructurales a los glucolípidos naturales, tales como los glucoesfingolípidos y los glucoglicerolípidos, son capaces de inducir fuertes respuestas inmunológicas en vacunas tanto de virus herpes simplex como del virus de la pseudorrabia. Se han sintetizado algunos glucolípidos a partir de alquilaminas de cadena larga y ácidos grasos que se encuentran unidos directamente a los azúcares a través del átomo de carbono anomérico, imitando las funciones de los residuos lipídicos de origen natural.

La patente US nº 4.258.029 de Moloney, asignada al cesionario de la presente invención e incorporada a la presente memoria como referencia, enseña que el hidrocloreto de octadeciltirosina (OTH) funciona como adyuvante cuando se encuentra acompañado con el toxoide tetánico y vacuna de virus de la poliomiélitis de tipo I, II y III inactivado con formalina. Además, Nixon-George *et al.* (ref. 61) informan de que los ésteres octodecilo de aminoácidos aromáticos acompañados con un antígeno de superficie de virus recombinante de la hepatitis B incrementaron las respuestas inmunológicas del huésped contra el virus de la hepatitis B.

Ejemplos

La exposición anterior describe de manera general la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa haciendo referencia a los Ejemplos específicos siguientes. Estos Ejemplos se describen únicamente a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención. Se contemplan modificaciones de forma y sustitución de equivalentes según sugieran u obliguen las circunstancias. Aunque se han utilizado términos específicos en la presente memoria, estos términos pretenden poseer un sentido descriptivo y no fines limitativos.

Los procedimientos de bioquímica de proteínas, fermentación e inmunología utilizados pero no descritos explícitamente en la presente exposición y en los presentes Ejemplos se encuentran ampliamente descritos en la literatura científica y se encuentran perfectamente comprendidos dentro de los conocimientos de un experto en la materia.

Ejemplo 1

El presente Ejemplo describe el crecimiento de *Bordetella pertussis*.

Inóculo parental

Se mantuvieron cultivos de inóculo parental de una cepa de *Bordetella pertussis* en lotes de inóculo liofilizado, a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C.

ES 2 271 969 T3

Inóculo de trabajo

El cultivo liofilizado se recuperó en medio Hornibrook y se utilizó para sembrar placas de ágar Bordet-Gengou (BGA). El medio Hornibrook presenta la composición siguiente:

Componente	para 1 litro
Hidrolizado de caseína (tratado con carbono activo)	10,0 g
Ácido nicotínico	0,001 g
Cloruro de calcio	0,002 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Hexahidrato de cloruro de magnesio	0,025 g
Cloruro de potasio	0,200 g
Fosfato de potasio dibásico	0,250 g
Almidón	1,0 g
Agua destilada	enrasado a 1,0 litro

El pH se ajustó a $6,9 \pm 0,1$ con solución de carbonato sódico al 1%. El medio se dispensó en tubos y se esterilizó con vapor en el autoclave durante 20 minutos y autoclavado durante 20 minutos a una temperatura comprendida entre 121°C y 124°C. El inóculo se subcultivó dos veces, en primer lugar en placas de BGA, después en ágar de componente pertussis (CPA). El ágar de componente pertussis (CPA) presenta la composición siguiente:

NaCl	2,5 g/l
KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
KCl	0,2 g/l
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,1 g/l
Base Tris	1,5 g/l
Ácidos casamino	10,0 g/l
Glutamato NaH	10,0 g/l
HCl conc.	hasta pH 7,2
Ágar	15,0 g/l
Factores de crecimiento (CPGF)	10,0 ml/l

Los factores de crecimiento de componente pertussis (CPGF) - 100X presentan la composición siguiente:

HCl de L-cisteína	4,0 g/l
Niacina	0,4 g/l
Ácido ascórbico	40,0 g/l
Glutación, reducido	15,0 g/l
Fe ₂ SO ₄ , (H ₂ O) ₇	1,0 g/l
Dimetil-β-ciclodextrina	100 g/l
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	2,0 g/l

El cultivo final se suspendió en tampón de suspensión de inóculo de pertussis (CPSB), se dispensó en alícuotas de 2 a 4 ml, y se almacenó congelado a una temperatura comprendida entre -60°C y -85°C. El tampón de suspensión de inóculo de pertussis (PSSB) presentaba la composición siguiente:

Ácidos casamino	10,0 g/l
Base Tris	1,5 g/l
Glicerol anhidro	100 ml/l
HCl conc.	hasta pH 7,2

Estas suspensiones en glicerol proporcionaron el material de partida para la preparación del inóculo de trabajo.

Procedimiento de cultivo

La propagación del inóculo de trabajo se llevó a cabo en botellas de Roux de ágar componente pertussis durante 4 a 7 días a una temperatura comprendida entre 34°C y 38°C. Tras este cultivo, se lavó el ágar de las células con caldo de componente pertussis (CPB). Las muestras se observaron mediante tinción Gram, para pureza y opacidad del cultivo.

ES 2 271 969 T3

Las células se transfirieron a matraces cónicos de 4 litros que contenían CPB y se incubaron a una temperatura comprendida entre 34°C y 38°C durante 20 a 26 horas bajo agitación. Las muestras se observaron con tinción Gram y se comprobó la pureza del cultivo. Los matraces se agruparon y la suspensión se utilizó para inocular dos fermentadores que contenían CPB (volumen de 10 litros partiendo a una DO₆₀₀ de 0,1 a 0,4). El inóculo se cultivó hasta una DO₆₀₀ final de 5,0 a 10,0. Las muestras se analizaron con tinción Gram para la pureza del cultivo, mediante ELISA específicas de antígeno y para esterilidad.

Ejemplo 2

El presente Ejemplo describe la purificación de antígenos del cultivo celular de *Bordetella pertussis*.

Producción de caldo y concentrados celulares

Se cultivó una suspensión bacteriana en dos fermentadores de producción, a una temperatura comprendida entre 34°C y 37°C durante 35 a 50 horas. Los fermentadores se muestrearon para el análisis de la esterilidad de los medios. La suspensión se alimentó a una centrífuga de discos de flujo continuo (12.000 x g) para separar las células del caldo. Las células se recogieron hasta la extracción del componente fimbria. El licor clarificado se pasó a través de un filtro de membrana de $\leq 0,22 \mu\text{m}$. El licor filtrado se concentró mediante ultrafiltración utilizando una membrana de límite nominal de peso molecular (NMWL) de entre 10 y 30 kDa. El concentrado se almacenó hasta la separación y purificación de los componentes toxina pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) y 69 kDa (pertactina).

Separación de los componentes del caldo

Los componentes del caldo (69 kDa, PT y FHA) se separaron y se purificaron mediante etapas de cromatografía en perlita y elución selectiva, esencialmente tal como se describe en la patente EP n° 336.736 y la solicitud de patente PCT de los presentes solicitantes WO n° 91/15505, descrita anteriormente. Las operaciones de purificación específica llevadas a cabo se describen a continuación.

Toxina pertussis (PT)

La columna de perlita se lavó con tampones Tris 50 mM, Tris 50 mM/Triton X-100 al 0,5% y Tris 50 mM. La fracción PT se eluyó de la columna de perlita con tampón Tris 50 mM/NaCl 0,12 M.

La fracción PT de la cromatografía en perlita se cargó en una columna de hidroxilapatito y después se lavó con tampón de fosfato de potasio 30 mM. La PT se eluyó con tampón de fosfato de potasio 75 mM/NaCl 225 mM. La columna se lavó con fosfato de potasio 200 mM/NaCl 0,6 M, obteniendo la fracción FHA, que se descartó. Se añadió glicerol a la PT purificada hasta el 50% y la mezcla se almacenó a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C hasta la destoxificación, dentro de la semana.

Hemaglutinina filamentosa (FHA)

Se eluyó la fracción FHA de la columna de perlita con Tris 50 mM/NaCl 0,6 M. Se purificó la hemaglutinina filamentosa mediante cromatografía sobre hidroxilapatito. La fracción FHA de la columna de perlita se cargó en una columna de hidroxilapatito, después se lavó con fosfato de potasio 30 mM que contenía Tritón X-100 al 0,5%, seguido de tampón de fosfato de potasio 30 mM. La fracción PT se eluyó con tampón de fosfato de potasio 85 mM y se descartó. A continuación, la fracción FHA se eluyó con fosfato de potasio 200 mM/NaCl 0,6 M y se almacenó a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C hasta la destoxificación dentro de la semana.

69 kDa (pertactina)

Se diluyó el concentrado de caldo con agua para inyección (WFI) para conseguir una conductividad de 3 a 4 mS/cm y se cargó en una columna de perlita a una carga de 0,5 a 3,5 mg de proteína por ml de perlita. El eluido (fracción de componente de 69 kDa) se concentró mediante ultrafiltración utilizando una membrana de 10 a 30 kDa de NMWL. Se añadió sulfato amónico al concentrado eluido hasta el 35% \pm 3% (p/v) y la mezcla resultante se almacenó a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C durante 4 \pm 2 días o se centrifugó (7.000 x g) inmediatamente. El sobrenadante en exceso se decantó y el precipitado se recogió mediante centrifugación (7.000 x g). El pellet de 69 kDa se almacenó congelado a una temperatura comprendida entre -20°C y -30°C o se disolvió en tampón Tris o fosfato y se utilizó inmediatamente.

Se utilizó para la purificación la proteína de membrana externa de 69 kDa obtenida mediante la precipitación con sulfato amónico al 35% (p/v) del eluido de perlita concentrado. Se añadió sulfato amónico (100 \pm 5 g por litro) a la fracción de 69 kDa y la mezcla se agitó durante por lo menos 2 horas a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C. La mezcla se centrifugó (7.000 x g) para recuperar el sobrenadante. Se añadió sulfato amónico (100 a 150 g por litro) al sobrenadante y la mezcla se agitó durante por lo menos 2 horas a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C. La mezcla se centrifugó (7.000 x g) para recuperar el pellet, que se disolvió en Tris 10 mM, HCl, pH 8. Se ajustó la fuerza iónica de la solución al equivalente de HCl de Tris 10 mM (pH 8), que contenía sulfato amónico 15 mM.

ES 2 271 969 T3

Se aplicó la proteína de 69 kDa a una columna de hidroxilapatito conectada en tándem con una columna de Q-sefarosa. La proteína de 69 kDa se recogió en el eluido, se lavó de las columnas con Tris 10 mM, HCl (pH 8), que contenía sulfato amónico 15 mM y se agrupó con proteína de 69 kDa en el eluido. El pool de proteína de 69 kDa se diafiltró con 6 a 10 volúmenes de fosfato de potasio 10 mM (pH 8) que contenía NaCl 0,15 M en una membrana de 100 a 300 kDa de NMWL. Se recogió el ultrafiltrado y se concentró la proteína de 69 kDa en el ultrafiltrado.

La proteína de 69 kDa se intercambió en solvente en HCl de Tris 10 mM (pH 8) y se adsorbió en Q-sefarosa, se lavó con HCl de Tris 10 mM (pH 8)/sulfato amónico 5 mM. La proteína de 69 kDa se eluyó con fosfato de potasio 50 mM (pH 8). La proteína de 69 kDa se diafiltró con 6 a 10 volúmenes de fosfato de potasio 10 mM (pH 8) que contenía NaCl 0,15 M en una membrana de 10 a 30 kDa de NMWL. La proteína de 69 kDa se esterilizó por filtración a través de un filtro de $\leq 0,22 \mu\text{m}$. Esta masa estéril se almacenó a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C y se llevó a cabo la adsorción dentro de los tres meses.

Aglutinógenos fimbriales

Los aglutinógenos se purificaron a partir de la pasta celular tras la separación del caldo. La pasta celular se diluyó a una fracción de volumen de 0,05 de células en un tampón que contenía fosfato de potasio 10 mM, NaCl 150 mM y urea 4 M y se mezcló durante 30 minutos. El lisado celular se clarificó mediante centrifugación (12.000 x g), después se concentró y se diafiltró frente a fosfato de potasio 10 mM/NaCl 150 mM/Tritón X-100 al 0,1% utilizando un filtro de membrana de 100 a 300 kDa de NMWL.

El concentrado se trató por calor a 80°C durante 30 minutos, después se clarificó mediante centrifugación (9.000 x g). Se añadió PEG 8000 al sobrenadante clarificado hasta una concentración final de $4,5\% \pm 0,2\%$ y se agitó suavemente durante un mínimo de 30 minutos. El precipitado resultante se recogió mediante centrifugación (17.000 x g) y el pellet se extrajo con tampón de fosfato de potasio 10 mM/NaCl 150 mM para proporcionar una solución cruda de aglutinógeno fimbrial. Los aglutinógenos fimbriales se purificaron mediante paso sobre sílice PEI. La solución cruda se diluyó hasta 100 mM con respecto al fosfato de potasio utilizando tampón de fosfato de potasio 1 M y se pasó a través de una columna de sílice-PEI.

El eluido de las columnas se concentró y se diafiltró frente a tampón de fosfato de potasio 10 mM/NaCl 150 mM utilizando un filtro de membrana de 100 a 300 kDa NMWL.

Esta masa estéril se almacenó a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C y se llevó a cabo la adsorción dentro de los tres meses. La preparación de aglutinógeno fimbrial contenía Agg2 fimbrial y Agg3 fimbrial en una proporción en peso de entre aproximadamente 1:5 y aproximadamente 2:1 y se descubrió que se encontraba sustancialmente libre de Agg1.

Ejemplo 3

El presente Ejemplo describe la producción de toxoide de los antígenos purificados de *Bordetella pertussis*, PT y FHA.

Se preparó el toxoide de PT preparada en forma pura tal como se describe en el Ejemplo 2, mediante el ajuste de la concentración de glutaraldehído en la solución de PT hasta $0,5\% \pm 0,1\%$ e incubando a $37^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ durante 4 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de L-aspartato hasta $0,21 \pm 0,02$ M. A continuación, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante $1 \pm 0,1$ horas y después a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C durante 1 a 7 días.

La mezcla resultante se diafiltró frente a tampón de fosfato de potasio 10 mM/NaCl 0,15 M/glicerol al 5% en un filtro de membrana de 30 kDa de NMWL y después se esterilizó mediante paso a través de un filtro de membrana de $\leq 0,22 \mu\text{m}$. Esta masa estéril se almacenó a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C y se llevó a cabo la adsorción dentro de los tres meses.

Se produjo el toxoide de la fracción FHA, preparada en forma pura tal como se describe en el Ejemplo 2, mediante el ajuste de las concentraciones de L-lisina y de formaldehído a 47 ± 5 mM y $0,24 \pm 0,05\%$, respectivamente, e incubando a una temperatura comprendida entre 35°C y 38°C durante 6 semanas. A continuación, la mezcla se diafiltró frente a fosfato de potasio 10 mM/NaCl 0,5 M utilizando un filtro de membrana de 30 kDa de NMWL y se esterilizó mediante paso a través de un filtro de membrana. Esta masa estéril se almacenó a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C y se llevó a cabo la adsorción dentro de los tres meses.

Ejemplo 4

El presente Ejemplo describe la adsorción de los antígenos purificados de *Bordetella pertussis*.

Para la adsorción individual de PT, FHA, Agg y 69 kDa sobre fosfato de aluminio (alumbre), se preparó una solución madre de fosfato de aluminio a una concentración de $18,75 \pm 1$ mg/ml. Se preparó un recipiente adecuado y cualquiera de los antígenos se dispensó asépticamente en el recipiente. Se añadió asépticamente 2-fenoxietanol, rindiendo una concentración final de $0,6\% \pm 0,1\%$ v/v y se agitó hasta la homogeneidad. Se añadió asépticamente el

ES 2 271 969 T3

volumen apropiado de fosfato de aluminio al recipiente. Se añadió un volumen apropiado de agua destilada estéril, llevando la concentración final a 3 mg de fosfato de aluminio/ml. Los recipientes se sellaron y se etiquetaron y se dejaron bajo agitación a temperatura ambiente durante 4 días. A continuación, el recipiente se almacenó hasta la preparación de la formulación final.

Ejemplo 5

El presente Ejemplo describe la formulación de una vacuna de componente pertussis combinada con toxoides diftérico y tetánico.

Se formularon los antígenos de *B. pertussis* preparados tal como se ha descrito en los Ejemplos anteriores con toxoides diftérico y tetánico para proporcionar varias vacunas de componente pertussis (CP) tal como se describe posteriormente.

Los componentes pertussis se produjeron a partir de *Bordetella pertussis* cultivada en cultivo sumergido tal como se describe en detalle en los Ejemplos 1 a 4 anteriormente. Tras completar el cultivo, el caldo de cultivo y las células bacterianas se separaron mediante centrifugación. Se purificó individualmente cada antígeno. Se purificaron la toxina pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) del caldo mediante cromatografía secuencial sobre perlita e hidroxilapatito. Se detoxificó la PT con glutaraldehído y cualquier PT residual (aproximadamente el 1%) presente en la fracción FHA se detoxificó con formaldehído. Se prepararon aglutinógenos fimbriales (2+3) a partir de las células bacterianas. Las células se rompieron con urea y se trataron por calor, y los aglutinógenos fimbriales se purificaron mediante precipitación con polietilenglicol y cromatografía sobre polietilenimina-sílice. El componente proteína de 69 kDa (pertactina) se aisló del eluido de la etapa de cromatografía de perlita (Ejemplo 2) mediante precipitación con sulfato amónico, y se purificó mediante cromatografía secuencial sobre hidroxilapatito y Q-sefara. Todos los componentes se esterilizaron mediante filtración a través de un filtro de membrana de 0,22 μm .

Se preparó toxoide diftérico a partir de *Corynebacterium diphtheriae* cultivada en cultivo sumergido mediante procedimientos estándar. La producción de toxoide diftérico se dividió en cinco etapas: mantenimiento del inóculo de trabajo, cultivo de *Corynebacterium diphtheriae*, recolección de la toxina diftérica, detoxificación de la toxina diftérica y concentración del toxoide diftérico.

Preparación de toxoide diftérico

(I) Inóculo de trabajo

Se mantuvo la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* en forma de lote de inóculo liofilizado. El inóculo reconstituido se cultivó en pendientes de Loeffler durante 18 a 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, y después se transfirió a matraces de medio diftérico. A continuación, se analizó el cultivo para pureza y contenido de Lf. El inóculo restante se utilizó para inocular un fermentador.

(II) Cultivo de Corynebacterium diphtheriae

El cultivo se incubó a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se agitó en el fermentador. Se añadieron al cultivo cantidades predeterminadas de soluciones de sulfato ferroso, de cloruro de calcio y de fosfato. Las cantidades reales de cada solución (fosfato, sulfato ferroso, cloruro cálcico) se determinaron experimentalmente para cada lote de medio. Los niveles seleccionados son los que proporcionan el contenido de Lf más alto. Al final del ciclo de crecimiento (30 a 50 horas), los cultivos se muestrearon para pureza y contenido de Lf.

El pH se ajustó con bicarbonato sódico, y el cultivo se inactivó con tolueno al 0,4% durante 1 hora a una temperatura mantenida de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A continuación, se llevó a cabo un ensayo de esterilidad para confirmar la ausencia de *C. diphtheriae* vivas.

(III) Recolección de toxina diftérica

Se agruparon los cultivos tratados con tolueno de uno o varios fermentadores en un tanque de grandes dimensiones. Se añadió bicarbonato sódico aproximadamente al 0,12%, carbono activo al 0,25% y sulfato amónico al 23%, y se midió el pH.

La mezcla se agitó durante aproximadamente 30 minutos. Se añadió tierra diatomácea y la mezcla se bombeó hasta el interior de un filtro de profundidad. El filtrado se recirculó hasta que se volviese transparente, se recogió a continuación, y se muestreó para el contenido de Lf. Se añadió sulfato amónico adicional al filtrado hasta alcanzar una concentración del 40%. También se añadió tierra diatomácea. Esta mezcla se mantuvo 3 a 4 días a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C para permitir que sedimentase el precipitado. Se recogió la toxina precipitada y se disolvió en solución salina al 0,9%. Se separó la tierra diatomácea mediante filtración y la toxina se dializó frente a solución salina al 0,9%, para eliminar el sulfato amónico. La toxina dializada se agrupó y se muestreó para el contenido de Lf y el análisis de pureza.

ES 2 271 969 T3

(IV) Destoxificación de la toxina diftérica

La destoxificación tuvo lugar inmediatamente después de la diálisis. Para la destoxificación, la toxina se diluyó de manera que la solución final contuviese:

- a) toxina diftérica a $1.000 \pm 10\%$ Lf/ml
- b) bicarbonato sódico al 0,5%
- c) formalina al 0,5%
- d) monohidrocloreuro de L-lisina al 0,9% p/v

La solución se llevó hasta el volumen con solución salina y el pH se ajustó a $7,6 \pm 0,1$.

El toxoide se filtró a través de filtros de celulosa-tierra diatomácea y/o un prefiltro de membrana y un filtro de membrana de $0,2 \mu\text{m}$ en el recipiente de recolección y se incubó durante 5 a 7 semanas a 34°C . Se extrajo una muestra para el análisis de toxicidad.

(V) Concentración del toxoide purificado

Los toxoides se agruparon, después se concentraron mediante ultrafiltración, y se recogieron en un recipiente adecuado. Se extrajeron muestras para el contenido de Lf y el análisis de pureza. Se añadió el conservante (2-fenoxietanol) para proporcionar una concentración final del 0,375% y el pH se ajustó a un valor comprendido entre 6,6 y 7,6.

El toxoide se esterilizó mediante filtración a través de un prefiltro y un filtro de membrana de $0,2 \mu\text{m}$ (o equivalente) y se recogió. A continuación, el toxoide estéril se muestreó para la irreversibilidad del contenido de Lf de toxoide, contenido de conservante, pureza (contenido de nitrógeno), esterilidad y análisis de toxicidad. El toxoide concentrado estéril se almacenó a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C hasta la formulación final.

Preparación de toxoide tetánico

Se preparó toxoide tetánico (T) a partir de *Clostridium tetani* cultivado en cultivo sumergido.

La producción de toxoide tetánico puede dividirse en cinco etapas: mantenimiento del inóculo de trabajo, cultivo de *Clostridium tetani*, recolección de la toxina tetánica, destoxificación de la toxina tetánica y purificación del toxoide tetánico.

(I) Inóculo de trabajo

La cepa de *Clostridium tetani* utilizada en la producción de toxina tetánica para la conversión a toxoide tetánico se mantuvo en la forma liofilizada en un lote inóculo. El inóculo se inoculó en medio tioglicolato y se dejó en cultivo durante aproximadamente 24 horas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Se extrajo una muestra para el análisis de la pureza del cultivo.

(II) Cultivo de *Clostridium tetani*

El medio del tétanos se dispensó en un fermentador, se trató por calor y se enfrió. A continuación, el fermentador se inoculó y el cultivo se dejó crecer durante 4 a 9 días a $34^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Se extrajo una muestra para el análisis de la pureza del cultivo, y el análisis del contenido de Lf.

(III) Recolección de toxina tetánica

La toxina se separó mediante filtración a través de filtros de celulosa-tierra diatomácea, y la toxina clarificada se esterilizó a continuación por filtración utilizando filtros de membrana. Se extrajeron muestras para el contenido de Lf y el análisis de esterilidad. La toxina se concentró mediante ultrafiltración utilizando un tamaño de poro de 30.000 daltons.

(IV) Destoxificación de la toxina tetánica

La toxina se muestreó para el análisis del contenido de Lf previamente a la destoxificación. La toxina concentrada (475 a 525 Lf/ml) se destoxificó mediante la adición de bicarbonato sódico al 0,5% p/v, formalina al 0,3% v/v y monohidrocloreuro de L-lisina al 0,9% p/v y se llevó hasta el volumen con solución salina. El pH se ajustó a $7,5 \pm 0,1$ y la mezcla se incubó a 37°C durante 20 a 30 días. Se extrajeron muestras para el análisis de esterilidad y de toxicidad.

(V) Purificación de toxoide

El toxoide concentrado se esterilizó a través de prefiltros, seguido de filtros de membrana de $0,2 \mu\text{m}$. Se extrajeron muestras para el análisis de esterilidad y de contenido de Lf.

ES 2 271 969 T3

La concentración óptima de sulfato amónico se basó en una curva "S" de fraccionamiento determinada a partir de muestras del toxoide. La primera concentración se añadió al toxoide (diluido hasta 1.900-2.100 Lf/ml). La mezcla se mantuvo durante por lo menos 1 hora a una temperatura comprendida entre 20°C y 25°C y el sobrenadante se recogió, y el precipitado que contenía la fracción de elevado peso molecular se descartó.

5 Se añadió una segunda concentración de sulfato amónico al sobrenadante para el segundo fraccionamiento para eliminar las impurezas de peso molecular reducido. La mezcla se mantuvo durante por lo menos 2 horas a una temperatura comprendida entre 20°C y 25°C; posteriormente pudo mantenerse a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C durante un máximo de tres días. El precipitado, que representa el toxoide purificado, se recogió mediante
10 centrifugación y filtración.

Se eliminó el sulfato amónico del toxoide purificado mediante diafiltración utilizando membranas de ultrafiltración Amicon (o equivalente) con PBS hasta que ya no pudo detectarse más sulfato amónico en la solución de toxoide. El pH se ajustó a un valor comprendido entre 6,6 y 7,6, y se añadió 2-fenoxietanol para proporcionar una concentración
15 final del 0,375%. El toxoide se esterilizó mediante filtración con membrana, y se extrajeron muestras para el análisis (irreversibilidad del toxoide, contenido de Lf, contenido de conservante, pureza, esterilidad y toxicidad).

Formulación de vacuna multivalente

20 Una formulación de una vacuna de componente pertussis combinada con toxoides diftérico y tetánico se denominó CP_{10/5/5/3}DT (en ocasiones denominado CLÁSICA). Cada dosis humana de 0,5 ml de CP_{10/5/5/3}DT se formuló para que contuviese:

- 25 10 µg de toxoide pertussis (PT)
- 5 µg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
- 5 µg de aglutinógenos fimbriales 2 y 3 (FIMB)
- 30 3 µg de proteína de membrana externa de 69 kDa
- 15 Lf de toxoide diftérico
- 35 5 Lf de toxoide tetánico
- 1,5 mg de fosfato de aluminio
- 0,6% 2-fenoxietanol como conservante

40 Otra formulación de vacuna de componente pertussis combinada con toxoides diftérico y tetánico se denominó CP_{10/5/5}DT (en ocasiones denominada HYBRID). Cada 0,5 ml de dosis humana de CP_{10/5/5}DT se formuló para que contuviese:

- 45 10 µg de toxoide pertussis (PT)
- 5 µg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
- 5 µg de aglutinógenos fimbriales 2 y 3 (FIMB)
- 50 15 Lf de toxoide diftérico
- 5 Lf de toxoide tetánico
- 1,5 mg de fosfato de aluminio
- 55 0,6% 2-fenoxietanol como conservante

Otra formulación de vacuna de componente pertussis combinada con toxoides diftérico y tetánico se denominó
60 CP_{20/20/5/3}DT. Cada 0,5 ml de dosis humana de CP_{20/20/5/3}DT se formuló para que contuviese:

- 20 µg de toxoide pertussis (PT)
- 20 µg de hemaglutinina filamentosa (FHA)
- 65 5 µg de aglutinógenos fimbriales 2 y 3 (FIMB)
- 3 µg de proteína de membrana externa de 69 kDa

ES 2 271 969 T3

15 Lf de toxoide diftérico

5 Lf de toxoide tetánico

5 1,5 mg de fosfato de aluminio

0,6% 2-fenoxietanol como conservante

10 Una formulación adicional de una vacuna de componente pertussis combinada con toxoides diftérico y tetánico se denominó CP_{20/10/10/6}DT. Cada 0,5 ml de dosis humana de CP_{20/10/10/6}DT se formulo para que contuviese:

20 µg de toxoide pertussis (PT)

15 10 µg de hemaglutinina filamentosa (FHA)

10 µg de aglutinógenos fimbriales 2 y 3 (FIMB)

6 µg de proteína de membrana externa de 69 kDa

20 15 Lf de toxoide diftérico

5 Lf de toxoide tetánico

25 1,5 mg de fosfato de aluminio

0,6% 2-fenoxietanol como conservante

Ejemplo 6

30 El presente Ejemplo describe la evaluación clínica de las vacunas de componente pertussis acelulares.

(a) Estudios en adultos

35 Los estudios en adultos y niños de edades comprendidas entre 16 y 20 meses indicaron que las vacunas multicomponente que contenían aglutinógenos fimbriales eran seguras e inmunogénicas (Tabla 2).

40 Se llevó a cabo un estudio clínico de fase I con niños de 17 y 18 meses de edad en Calgary, Alberta, con la vacuna de pertussis de cinco componentes (CP_{10/5/5/3}DT), informándose de las reacciones adversas. Treinta y tres niños recibieron la vacuna y además 35 recibieron la misma vacuna sin el componente de proteína de 69 kDa.

45 Las reacciones locales fueron raras. Se observaron reacciones adversas sistémicas, consistentes principalmente en irritabilidad, en aproximadamente la mitad de los participantes en el estudio, con independencia de la vacuna administrada. Se midieron incrementos significativos de anticuerpos para los anticuerpos IgG anti-PT, anti-FHA, anti-aglutinógenos fimbriales y anti-69 kDa mediante inmunoensayo enzimático, y anticuerpos anti-PT en el ensayo de neutralización de células CHO. No se detectaron diferencias en la respuesta de anticuerpos en niños que habían recibido la vacuna de cuatro componentes (CP_{10/5/5}DT) o de cinco componentes (CP_{10/5/5/3}DT) excepto en el anticuerpo anti-69 kDa. Los niños que habían recibido la vacuna de cinco componentes que contenía la proteína de 69 kDa presentaron un nivel de anticuerpos anti-69 kDa posteriormente a la inmunización significativamente más elevado.

50 Se llevó a cabo un estudio de dosis-respuesta con la vacuna de 4 componentes en Winnipeg, Manitoba, Canadá. Se utilizaron formulaciones de vacuna de dos componentes: CP_{10/5/5/3}DT y CP_{20/10/10/6}DT. También se incluyó como control una vacuna DPT de células completas.

55 Este estudio fue de doble ciego en 91 niños de 17 a 18 meses de edad en el momento de la dosis de refuerzo de pertussis. Ambas vacunas, CP_{10/5/5/3}DT y CP_{20/10/10/6}DT, fueron bien toleradas por estos niños. No se demostraron diferencias en el número de niños que habían manifestado alguna reacción local, o reacciones sistémicas tras ninguna de las vacunas de componentes. En contraste, un número significativamente mayor de niños que habían recibido la vacuna de células completas presentó reacciones locales y sistémicas que los que habían recibido la vacuna de componentes CP_{20/10/10/6}DT.

60 Estudios en niños

Fase II

65 Se llevó a cabo un estudio utilizando la vacuna CP_{10/5/5/3}DT en Calgary, Alberta y British Columbia, Canadá. En este estudio, 432 niños recibieron la vacuna de componente pertussis o la vacuna DPT de control de células completas a los 2, 4 y 6 meses de edad. La vacuna CP_{10/5/5/3}DT fue bien tolerada por estos niños. Las reacciones locales fueron menos frecuentes con la vacuna de componentes que la vacuna de células completas tras cada dosis.

ES 2 271 969 T3

Se demostró una respuesta de anticuerpos significativa frente a todos los antígenos tras la vacunación con la vacuna de componente pertussis. Los receptores de la vacuna de células completas presentaron una vigorosa respuesta de anticuerpos frente a los aglutinógenos fimbriales D y T. A los siete meses, entre 82% y 89% de los receptores de vacuna de componentes, y el 92% de los receptores de vacuna de células completas presentaron un incremento de cuatro veces o más en el título de anticuerpos contra aglutinógenos fimbriales. En contraste, la respuesta de anticuerpos contra FHA fue de 75% a 78% en las vacunas de componentes comparado con el 31% de los receptores de vacunas de células completas. Se observó un incremento de cuatro veces en el anticuerpo anti-69 kDa en 90% a 93% de las vacunas de componentes, y en 75% de los receptores de vacuna de células completas. Se observó un incremento de cuatro veces en los anticuerpos contra PT según el inmunoensayo enzimático en 40% a 49% de las vacunas de componentes, y en 32% de las vacunas de células completas, se encontró un incremento de cuatro veces en los anticuerpos anti-PT según la neutralización de CHO en 55% a 69% de las vacunas de componentes, y en 6% de las vacunas de células completas (Tabla 2).

Fase IIB

Se evaluaron las vacunas CP_{20/20/5/3}DT y CP_{10/10/5/3}DT en un estudio ciego aleatorizado frente a un control D₁₅PT con un contenido de difteria más reducido de 15 Lf en comparación con una formulación de 25 Lf de 100 bebés de 2, 4 y 6 meses de edad. No se detectaron diferencias en las tasas de reacciones adversas entre las formulaciones de dos componentes; ambas fueron significativamente menos reactogénicas que el control de células completas. Se alcanzaron títulos de anticuerpos más elevados contra PT según el inmunoensayo enzimático y la neutralización de CHO y contra FHA en los receptores de la vacuna CP_{20/20/5/3}DT con un mayor contenido de antígeno. A los 7 meses, la media geométrica del título anti-FHA era de 95,0 en los receptores de CP_{20/20/5/3}DT, 45,2 en los receptores de CP_{10/5/5/3}DT y de sólo 8,9 en los receptores de D₁₅PT. Los títulos anti-PT eran de 133,3, 58,4 y 10,4 según el inmunoensayo, y de 82,4, 32,7 y 4,0 según la neutralización de CHO, respectivamente (Tabla 2).

Este estudio demostró que la vacuna de componente pertussis combinada con los toxoide diftérico y tetánico adsorbidos, con contenido de antígeno incrementado, eran seguros e inmunogénicos en bebés, y que el contenido de antígenos incrementado potenciaba la respuesta inmunológica contra los antígenos preparados (PT y FHA) sin incrementar la reactogenicidad.

Ensayo comparativo de fase II del NIAID (U.S.)

Se llevó a cabo un estudio de fase II en los Estados Unidos bajo los auspicios del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) como prelude de un ensayo de eficacia a gran escala de vacunas de pertussis acelulares. Se incluyó una vacuna de pertussis de la invención en combinación con toxoides diftérico y tetánico adsorbidos (CP_{10/5/5/3}DT) en este ensayo junto con 12 otras vacunas acelulares y 2 vacunas de células completas. Se informó de los resultados de seguridad de 137 niños inmunizados a los 2, 4 y 6 meses de edad con la vacuna de componentes CP_{10/5/5/3}DT.

Tal como se había observado en estudios anteriores, se constató que la vacuna de componentes era segura, de baja reactogenicidad y bien tolerada por las vacunas.

A los 7 meses, el anticuerpo anti-PT, el anticuerpo anti-FHA, el anticuerpo anti-69 kDa y el anticuerpo anti-aglutinógenos fimbriales eran todos más elevados o equivalentes a los niveles alcanzados tras la vacunación con vacunas de células completas (ref. 71 y Tabla 2). Se llevó a cabo un estudio de doble ciego en el que se asignaron aleatoriamente niños para recibir la formulación de vacuna CP_{20/20/5/3}DT o CP_{10/5/5/3}DT. Se incluyó un total de 2.050 bebés en los Estados Unidos y en Canadá; 1.961 bebés completaron el estudio. Ambas formulaciones de vacuna resultaron seguras, de baja reactogenicidad e inmunogénicas en estos bebés. La inmunogenicidad se evaluó en un subgrupo de 292. Ambas formulaciones de vacuna indujeron un incremento de anticuerpos frente a todos los antígenos contenidos en la vacuna. La formulación CP_{20/20/5/3}DT indujo títulos de anticuerpos más elevados contra FHA pero no contra PT. La formulación CP_{10/5/5/3}DT indujo títulos más elevados contra fimbrias y títulos más elevados de aglutinógenos.

En Francia se llevó a cabo otro estudio de seguridad e inmunogenicidad. El diseño del estudio era similar al estudio norteamericano descrito anteriormente, excepto en que las vacunas se administraron a los 2, 3 y 4 meses de edad. Las reacciones locales y sistémicas fueron generalmente menores. En global, la vacuna resultó bien aceptada por los participantes en el estudio francés utilizando este régimen de administración.

Ensayo de eficacia controlado con placebo de dos vacunas de pertussis acelulares y de una vacuna de células completas en 10.000 bebés

Tras los resultados del ensayo comparativo de fase II de la NIAID (U.S.), se seleccionó una vacuna acelular de dos componentes y una de cinco componentes para un ensayo de eficacia multicentro controlado doblemente aleatorizado y controlado con placebo. El ensayo clínico se llevó a cabo en Suecia, donde existe una elevada incidencia de pertussis. La vacuna de dos componentes contenía PT inactivada con gliceraldehído y formalina (25 µg), FHA tratada con formalina (25 µg) y toxoide diftérico 17 Lf y toxoide tetánico 10 Lf. La vacuna de pertussis de cinco componentes era CP_{10/5/5/3}DT.

ES 2 271 969 T3

Para el ensayo, se reclutaron diez mil niños, que representaban aproximadamente la mitad de los niños en este grupo de edad en Suecia, en 14 sitios de estudio geográficamente definidos mediante la utilización del registro de nacimientos.

5 Los niños nacidos en enero y febrero de 1992 se asignaron aleatoriamente en un ensayo de 3 brazos. Tras el consentimiento de los padres, dos tercios de los niños recibieron una de entre dos preparaciones de pertussis difteria-tétanos-acelular a los dos, cuatro y seis meses de edad. El grupo de control recibió DT únicamente. En mayo de 1992, se introdujo una vacuna DTP de células completas autorizada disponible comercialmente y los niños nacidos entre marzo y diciembre de 1992 se asignaron aleatoriamente en un ensayo de 4 brazos. Tras el consentimiento de los
10 padres, tres cuartos de los niños recibieron una de entre tres preparaciones DTP a los dos, cuatro y seis meses de edad. El grupo de control recibió DT únicamente.

Cada vacuna se administró a aproximadamente 2.500 niños. Las vacunas se administraron en tres dosis. La primera dosis se administró a los 2 meses de edad y no después de los 3 meses de edad. Las dosis posteriores se administraron a intervalos de 8 semanas. Las vacunas se administraron mediante inyección intramuscular.

Se realizó un seguimiento de los niños y de sus domicilios durante 30 meses. Si se sospechaba de pertussis, se recogían datos clínicos, y se buscaba la verificación de laboratorio mediante aspirados nasales para el cultivo bacteriológico y el diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se recogieron para el diagnóstico serológico muestras sanguíneas en las etapas aguda y convaleciente.

Previamente a este estudio, el nivel de pertactina proporcionado por las vacunas de componente pertussis de la presente invención en una población humana de riesgo (particularmente neonatos) era desconocido. En particular, se desconocía la contribución de diversos componentes *Bordetella* y su presencia en vacunas de pertussis en cantidades
25 relativas seleccionadas a la eficacia de las vacunas.

El objetivo principal del ensayo era estimar la capacidad de las vacunas de pertussis acelulares y de vacunas de células completas de proteger frente a la pertussis típica en comparación con un placebo.

Un objetivo secundario era explorar la eficacia de las vacunas contra una infección confirmada de pertussis de severidad variable.

La eficacia de una vacuna se define como la reducción en porcentaje de la probabilidad de contraer pertussis entre los receptores de vacuna comparado con los niños no vacunados.

El riesgo relativo de pertussis en los dos grupos de vacuna se expresa como la proporción entre las probabilidades de enfermedad en los dos grupos.

La probabilidad de contraer pertussis, también denominada tasa de ataque, puede estimarse de diferentes maneras. En los cálculos del tamaño muestral, la probabilidad de contraer pertussis en un grupo de estudio dado se estima como el cociente entre el número de niños con pertussis y los niños que quedaban en el grupo de estudio al finalizar el seguimiento del estudio.

La eficacia de la vacuna de componentes CP_{10/5/5/3}DT en este ensayo en la prevención de la pertussis típica se muestra en la Tabla 4 y era de aproximadamente el 85%. En el mismo ensayo, una vacuna acelular de pertussis de dos componentes que contenía sólo PT y FHA presentaba una eficacia aproximada del 58% y una vacuna de células completas presentaba una eficacia aproximada del 48%. La CP_{10/5/5/3}DT resultó asimismo eficaz en la prevención de la pertussis leve con una eficacia estimada de aproximadamente el 77%.

50 Ejemplo 7

(Comparativo)

El presente Ejemplo describe la formulación y la inmunogenicidad de una vacuna de combinación multivalente que contiene un polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae*.

(a) Preparación de componente PRP-T

Se purificó el polisacárido capsular (PRP) de *H. influenzae* y se conjugó con el toxoide tetánico de la manera siguiente. A partir de ampollas liofilizadas de lote de inóculo de trabajo de *H. influenzae*, se llevaron a cabo tres precultivos sucesivos. El primer precultivo era en medio sólido. Se inocularon ampollas en placas de ágar-carbono activo + sangre hervida (10% de sangre de caballo calentada durante 15 minutos a 80°C) y se incubaron durante 20 ± 4 horas a una temperatura comprendida entre 36°C y 37°C bajo CO₂. El segundo precultivo era en medio líquido durante 8 horas a 37°C. El medio líquido presentaba la composición por litro siguiente:

65

ES 2 271 969 T3

	1. Ácidos casamino Difco	10 g
	Fosfato monosódico·2H ₂ O	2,03 g
	Fosfato disódico·12H ₂ O	31,14 g
5	Lactato sódico (solución al 60%)	1,5 ml
	L-cistina	0,07 g
	L-triptófano	0,02 g
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
10	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g
	Antiespumante Dow Corning M.S.A. al 25% en aceite de parafina	0,15 ml
	2. Ultrafiltrado de hemina + dextrosa en la proporción de 20 g de dextrosa y 1 mg de hemina.	
	Esta solución se añadió a 5 mg de nicotinamida-adenina dinucleótido	
15	Esterilizado por filtración	
	3. Extracto de levadura Difco esterilizado por filtración	5 g

20 El tercer precultivo se realizó en medio líquido bajo agitación durante 4 horas a 37°C. El tercer precultivo se utilizó para inocular el fermentador y el cultivo se mantuvo bajo agitación a 37°C durante 12 a 14 horas. El cultivo se recogió en un tanque refrigerado. Se añadió formalina a una concentración de 10 ml/litro. El cultivo se mantuvo con agitación suave a +4°C durante 2 a 24 horas y después se centrifugó. La formalina añadida no pretendía inactiva por completo las bacterias, sino detener su crecimiento e inhibir su metabolismo. Esta adición redujo la lisis celular con la consecuente contaminación con componentes intracelulares. La duración de esta fijación fue de entre 2 y 24 horas y típicamente el cultivo se dejó durante la noche antes de centrifugarse. Se recogió el sobrenadante que contenía el polisacárido y se descartó el pellet bacteriano. El procedimiento de purificación se llevó a cabo generalmente en un cuarto frío o bajo condiciones que permitiesen que la temperatura de los productos y los reactivos fuese inferior o igual a +10°C excepto por la etapa de purificación con fenol, que se llevó a cabo a temperatura ambiente. Tras la centrifugación del cultivo, se concentró el sobrenadante del cultivo. El polisacárido capsular se precipitó del concentrado resultante mediante la adición de centrímida, proporcionando una concentración final del 5% p/v. La centrímida hizo precipitar el PS del líquido concentrado (SNF). También coprecipitó parte de las proteínas, ácidos nucleicos y lipopolisacáridos (LPS). Los precipitados se recogieron mediante centrifugación, dejando otros contaminantes y proteínas en el SNF. El pellet resultante se recogió mediante centrifugación y se almacenó a ≤ -20°C.

35 Los pellets se resuspendieron en solución de NaCl 0,3 M y la suspensión se centrifugó nuevamente. NaCl disoció selectivamente los complejos de polisacárido-centrímida. Durante el procedimiento también se disociaron algunos contaminantes (ácidos nucleicos, LPS, proteínas). Al sobrenadante se le añadió etanol absoluto preenfriado hasta una concentración final del 60%. El precipitado resultante se recogió mediante centrifugación y se lavó con etanol absoluto frío. El precipitado se secó bajo vacío a una temperatura comprendida entre 0°C y 4°C, proporcionando el producto intermedio. El producto intermedio se disolvió en tampón de acetato sódico y en fenol a temperatura ambiente. La fase acuosa se recogió mediante centrifugación continua. La extracción con fenol y la centrifugación pueden repetirse varias veces y dializarse y diafiltrarse la fase acuosa. El polisacárido capsular de la solución diafiltrada se precipitó mediante la adición de etanol preenfriado hasta una concentración final del 60% en presencia de NaCl 0,3 M. El precipitado se recogió mediante centrifugación, se lavó con etanol absoluto preenfriado, acetona y éter, y se secó bajo vacío a 4°C. A continuación, el precipitado se molió hasta formar polvos finos bajo humedad reducida, constituyendo este producto el polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b.

50 El polisacárido purificado se disolvió en agua con el fin de obtener 5 mg de polisacárido por ml de solución, y el pH se ajustó a 10,8 ± 0,2 con NaOH. Se añadió bromuro de cianógeno en forma de solución en agua en la proporción de 0,5 mg de CNBr/mg de polisacárido. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo con NaOH a 10,8 ± 0,2 durante 35 a 40 minutos a 23°C ± 3°C. El pH se redujo a pH 9 mediante la adición de HCl. SE añadió dihidrazido de ácido adáptico, proporcionando una concentración final de 3,5 mg de ADH/mg de polisacárido, y el pH se ajustó a 8,5. La mezcla de reacción se incubó a 23 ± 3°C durante 15 minutos (pH mantenido a 8,5) y después la solución se incubó durante la noche a +4°C, bajo agitación suave. La mezcla de reacción se dializó frente a una solución de NaCl y después se concentró. A continuación, la solución se filtró a través de un filtro de 0,45 μ y se congeló a ≤ 40°C. Esto constituye el AH-polisacárido y se almacenó a una temperatura ≤ -40°C.

60 Para producir el componente toxina tetánica, se inoculó una cepa de *Clostridium tetani* en una serie de tubos que contenían 10 ml de medio de Rosenow o medio tioglicolato. El medio Rosenow presenta la composición siguiente:

65

ES 2 271 969 T3

Fórmula (en gramos por litro de agua destilada)

Peptona	10
Extracto de carne	3
Glucosa	2
Cloruro sódico	5
Indicador "de Andrade" (ácido fucsina al 5%)	10 ml
Mármol blanco	1 trozo
Cerebro	1 trozo

El medio, preparado inmediatamente antes de la utilización a partir de productos listos para la utilización, se introdujo en tubos y se esterilizó a 120°C durante 20 minutos.

Se inoculó una botella de 5 litros que contenía 3 litros de medio "Massachusetts" con *C. tetani* y se incubó durante 16 a 18 horas a 35°C ± 1°C durante 16 horas. A continuación, el contenido se transfirió a una botella de 20 litros que contenía 15 litros de medio "Massachusetts" estéril y se incubó durante 8 horas a 35°C ± 1°C. Cada botella se utilizó para inocular un fermentador que contenía 582 litros de medio "Massachusetts" y se incubó a 35°C durante 5 a 6 días con aireación. Los fermentadores se enfriaron y al cultivo se añadieron 12 kg de cloruro sódico y 8 kg de citrato trisódico. Se mantuvo la agitación durante un día, después se detuvo y este procedimiento permitió la extracción de la toxina residual de las bacterias al final del cultivo. La toxina se clarificó mediante filtración o mediante paso a través de una centrifuga continua.

El sobrenadante procedente de 1.200 litros de cultivo se concentró mediante ultrafiltración y la toxina concentrada se diafiltró frente a solución 0,07 M de fosfato disódico, pH 8,2. El volumen final se ajustó para 500 Lf/ml.

Se llevó a cabo una doble precipitación con sulfato amónico para obtener la toxina tetánica purificada. De esta manera, se añadió lentamente sulfato amónico y 10 g de carbono activo por litro de la toxina diafiltrada obtenida anteriormente. Tras una incubación de 16 a 24 horas a +4°C, la toxina se filtró en cartuchos con el fin de eliminar el precipitado. A continuación, se añadió lentamente una cantidad de sulfato amónico suficiente para preparar 320 g/l por cada litro del sobrenadante obtenido anteriormente. Tras aproximadamente 48 horas a +4°C, se recogió el pellet mediante centrifugación y se disolvió en una solución de fosfato disódico 0,05 M, pH 8,2. La solución se diafiltró frente a una solución 0,05 M de fosfato disódico, pH 8,2, y se ajustó a 300 Lf/ml. Seguidamente, la solución se esterilizó por filtración. Se añadieron 7,5 μmoles (0,225%) de formaldehído por ml de la solución de toxina. Se consiguió la destoxicación tras incubar durante 24 días a +37°C, incluyendo periodos intermedios a +4°C y a +22°C. Se llevó a cabo la esterilización por filtración (0,22 μ) para obtener el toxoide tetánico. El toxoide tetánico se dializó y se concentró frente a NaCl utilizando un corte de peso molecular ≤ 50.000. A continuación, la proteína concentrada se filtró asépticamente y se almacenó a +4°C.

Se mezclaron cantidades iguales de AH-polisacárido y toxoide tetánico (± 20%) con NaCl 0,05 M, proporcionando una concentración de 7,5 mg de polisacárido por ml. El pH de la solución se ajustó a pH 5,7 ± 0,2 con adición de HCl y de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), proporcionando una concentración final de 19,17 mg de EDAC/ml de mezcla de reacción. Los grupos carboxilo de la proteína tetánica se activaron mediante la unión a EDAC. Bajo las condiciones ligeramente ácidas de la reacción, se produce a continuación una reacción de condensación en la que quedan unidos covalentemente AH-PS y la proteína tetánica activada por EDAC. La mezcla se incubó a pH constante (5,7) durante 60 minutos a +4°C y después el pH se ajustó a pH 6,9 ± 0,2 con NaOH y la mezcla de reacción se dializó frente a NaCl a +4°C. El conjugado se purificó mediante centrifugación zonal en un gradiente de sacarosa (entre 4% y 60%) para eliminar el EDAC, AH-polisacárido libre, proteína tetánica libre, y conjugado de bajo peso molecular. A continuación, a la fracción que contenía el conjugado de polisacárido se le añadió agua libre de pirógenos, sacarosa y tampón Tris-HCl para obtener una solución de conjugado de la composición siguiente:

sacarosa al 8,5% p/v ± 0,5%

polisacárido, conc. de aproximadamente 200 μg/ml

tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 ± 0,5

A continuación, la solución se filtró asépticamente utilizando un filtro de 0,2 μ y se almacenó a -40°C.

Se diluyó la masa de conjugado de polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b bajo condiciones estériles con diluyente con el fin de obtener la composición final siguiente:

Polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b	200 mg de polisacárido
Masa concentrada de conjugado hasta	10 mM
Tampón Tris-HCl 200 mM hasta pH 7,2 hasta	850 g
Sacarosa hasta	10 l
Agua para inyección hasta	10 l

ES 2 271 969 T3

La masa final se introdujo en viales y se liofilizó (la vacuna liofilizada se reconstituyó con 0,5 ml de NaCl al 0,4% para la utilización).

(b) *Formulación*

5 Se sometieron a ensayo dos formulaciones de la vacuna de componentes multivalente (APDT). La primera (APDT-baja) contenía 10 µg de toxoide pertussis (PT), 5 µg de hemaglutinina filamentosa (FHA), 5 µg de fimbria 2, 3 µg de proteína de 69 kDa (69K) por dosis de 0,5 ml (CLÁSICA). La segunda formulación (APDT-alta) contenía el doble de PT (20 µg) y cantidades idénticas de FIM y de 69K (HÍBRIDA). Ambas formulaciones contenían 15 Límites de
10 floculación (Lf) de toxoide diftérico, 5 Lf de toxoide tetánico, 1,5 mg de fosfato de aluminio como adyuvante y 2-fenoxietanol al 0,6% como conservante. Se produjo la vacuna de conjugado Hib-toxoide tetánico (PRPT) de la manera descrita anteriormente, en Connaught Laboratories Inc. (Swiftwater, U.S.A.).

Población

15 Se reclutaron para el estudio niños sanos de 17 a 21 meses de edad que habían sido inmunizados con tres dosis de APDT-baja o PRPT en forma de inyecciones separadas a los 2, 4 y 6 meses de edad en un ensayo clínico anterior. Tras obtener el consentimiento informado por escrito, los niños fueron asignados por una lista de bloque equilibrado de números aleatorios generada por ordenador para recibir PRT-T como inyección separada el mismo día, o como
20 inyección separada con la administración de PRP-T un mes después de la vacuna APDT, o como inyección única (PRP-T liofilizado reconstituido en APDT). La formulación en APDT (alta o baja) para cada niño siguió siendo la misma que la que se había utilizado para las tres primeras dosis (proporción de asignación 6:1 de APDT-alta; APDT-baja). Las vacunas se administraron i.m. con una aguja de 25 mm en el músculo deltoides del brazo o en el músculo vastus lateralis del muslo si el deltoides presentaba una masa insuficiente. En caso de requerirse una segunda inyección
25 para PRPT, la inyección se realizó en la extremidad contraria.

Seguimiento clínico y de laboratorio

30 Se realizó un seguimiento de los participantes para las reacciones adversas locales y sistémicas inmediatamente después de la inmunización y por parte de los padres a lo largo de las 72 horas posteriores a la inmunización. Se recogieron datos a través de una entrevista telefónica estructurada a las 24 y a las 72 horas. Se midió la temperatura corporal por lo menos una vez al día o siempre que los padres creyesen que el niño presentaba fiebre. Se clasificó la sensibilidad y las reacciones sistémicas (irritabilidad, actividad reducida, reducción de la ingesta) como leves, moderadas o severas según criterios preestablecidos, de manera que el progenitor seleccionaba un grado de severidad
35 basándose en ejemplos estructurados. Las mediciones de reacciones locales se clasificaron según su tamaño y el llanto prolongado según su duración.

Se recogieron muestras de sangre mediante venipunción o mediante pinchazo en el dedo previamente a la inmunización y 28 días después de la misma; en los niños administrados la inyección de PRP-T (por lo tanto, 2 meses después de PADT). Se midieron los anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib (PRP) mediante RIA. Se midieron los anticuerpos IgG contra PT mediante ELA y anticuerpo neutralizante de PT mediante neutralización de citotoxicidad en células de ovario de hámster chino (CHO). Se midieron los anticuerpos IgG anti-FHA, anti-FIM y anti-69K mediante EIA; las unidades se calcularon utilizando el antisuero de referencia de la FDA de US (nº 3). También se midieron las aglutininas de pertussis. Se midió la antitoxina diftérica mediante ensayo de microneutralización y la antitoxina tetánica mediante EIA. Los títulos de anticuerpo se expresaron como medias geométricas de títulos; las muestras de suero con títulos inferiores al límite de detección del ensayo fueron asignados un valor de una mitad del límite inferior de detección de cara a los cálculos estadísticos.

Análisis estadístico

50 Se analizaron las reacciones adversas tras agrupar para la significancia clínica. Se compararon las tasas de las reacciones adversas mediante estimaciones de Mantel-Haenszel de riesgo relativo utilizando centro y formulación de vacuna como variables de estratificación. Se calcularon estimaciones puntuales y IC al 95% del RR en cada caso. Los IC que no incluyen 1,00 son estadísticamente significativos.

55 Se calcularon las medias geométricas de títulos de anticuerpo y los IC al 95% para el título de anticuerpos contra cada antígeno de vacuna antes y después de la inmunización. Se compararon las medias de los logaritmos de los títulos mediante análisis de la varianza de tres factores. La proporción de sujetos que alcanzó niveles preespecificados en cada grupo se comparó mediante regresión logística. No se realizaron ajustes para las comparaciones múltiples.

60 Se incluyó un total de 545 niños (44% mujeres) en el estudio, el 74% de los que habían completado el estudio de series de niños. La proporción de participantes en este estudio que había recibido las dos formulaciones siguió siendo el mismo: 6:1 (468 APDT-alta, 77 APDT-baja). La edad media era de 18,9 meses (intervalo de 17 a 21 meses); del total sólo 3 niños no completaron el estudio (99,4%).

65

Reacciones adversas

Las tasas de reacciones adversas no resultaron diferentes en grupos inmunizados con APDT-alta O APDT-baja; las tasas fueron asimismo similares en inmunizaciones administradas separadamente en una visita, en visitas separadas o en una sola inyección combinada.

Respuesta de anticuerpos

Antes de la inmunización, los niveles de anticuerpos contra todos los antígenos excepto FHA eran similares en niños que habían recibido APDT-alta o APDT-baja en las tres primeras dosis. Los niños vacunados con APDT-alta con su contenido de FHA cuatro veces superior presentaron títulos de FHA significativamente más elevados que los niños inmunizados con APDT-baja ($p=0,0001$). Tras la inmunización, APDT-alta indujo títulos de anticuerpo más altos que APDT-baja ($p=0,0001$). En contraste, los títulos anti-PT previos a la inmunización medidos mediante neutralización de CHO o EIA fueron similares en los dos grupos. Paradójicamente, a pesar de presentar el doble de contenido antigénico, los títulos anti-PT eran menores tras la inmunización con APDT-alta que con APDT-baja ($p=0,038$). De manera similar, los anticuerpos anti-FIM y la aglutinina posteriores a la inmunización eran más elevados en el grupo APDT-baja ($p=0,01$ y $p=0,04$, respectivamente) a pesar de las cantidades idénticas de antígeno fimbrial en ambas formulaciones de vacuna.

Antes de la inmunización, se observaron pocas diferencias en los anticuerpos anti-pertussis del grupo asignado aleatoriamente a PRPT en combinación con APDT en forma de inyección única o administrado en forma de inyecciones separadas en el mismo día o en días separados (Tabla 9). Los datos se presentan separadamente para los receptores de APDT-alta o de APDT-baja; sin embargo, debido al reducido número de niños en el grupo de APDT-baja, estos resultados no se comentan adicionalmente. El grupo asignado aleatoriamente a recibir inyecciones separadas el mismo día presentó un título más alto de anticuerpos anti-PT según la neutralización de CHO que el grupo que estaba a punto de recibir las inyecciones posteriores en días separados (6,14 frente a 4,80 unidades; $p<0,05$). Los niveles de anticuerpos posteriores a la inmunización también fueron superiores en este grupo (176 unidades) que en el grupo de inyecciones separadas en días separados (122 unidades; $p<0,01$), aunque de manera similar se encontraron niveles más altos en el grupo que recibió la inmunización combinada única (171 unidades; $p<0,01$). Se detectaron respuestas de anticuerpos anti-69K en este grupo tras la inmunización, aunque los niños inmunizados con dos inyecciones el mismo día presentaron una respuesta de anticuerpos más elevada que los niños inmunizados con la vacuna combinada única, y los niños inmunizados con dos inyecciones el mismo día presentaron una respuesta de anticuerpos más alta que los niños inmunizados en días separados (243 frente a 190 unidades; $p<0,001$) y que los niños inmunizados con dos inyecciones en días separados.

Los niveles de anticuerpos anti-PRP fueron similares en los tres grupos previamente a la inmunización. Los títulos posteriores a la inmunización fueron más altos en los niños inmunizados con inyecciones separadas administradas el mismo día (66,0 $\mu\text{g/ml}$) que en niños inmunizados en días separados (28,4 $\mu\text{g/ml}$; $p<0,001$) o que en niños que recibieron la inmunización combinada única (47,1; $p<0,05$). La inmunización combinada también indujo niveles de anticuerpos significativamente más elevados que las vacunas administradas en días separados ($p<0,05$). No se detectaron diferencias entre grupos en el porcentaje que alcanzó niveles "protectores"; todos los participantes presentaron títulos posteriores a la inmunización superiores a 0,15 $\mu\text{g/ml}$ y sólo 4 participantes (0 a 0,7%) no alcanzaron un título superior a 1 $\mu\text{g/ml}$ (3 en el grupo administrado inyecciones separadas en días separados y uno en el grupo administrado la inyección combinada única). Más del 82% de los niños en cada grupo superó el nivel de anticuerpos anti-PRP de 10 $\mu\text{g/ml}$.

También se indujo una vigorosa respuesta de anticuerpos contra los toxoides diftérico y tetánico. En comparación con el grupo al que se administró la inmunización en días separados (2,1 IU/ml), se indujeron niveles de anticuerpos anti-difteria significativamente más elevados en niños inmunizados con dos inyecciones el mismo día (3,1 IU/ml; $p<0,01$) o que las inyecciones combinadas únicas (3,3 IU/ml; $p<0,001$). Los títulos de anticuerpos antitetanos fueron más elevados en los receptores de las dos inyecciones el mismo día (6,7 IU/ml) que en niños inmunizados en días separados (5,2 IU/ml; $p<0,01$) o en niños que recibieron la inyección combinada única (4,8 IU/ml; $p<0,001$). Todos los niños presentaron títulos de anticuerpos antidifteria y antitetanos posteriores a la inmunización superiores a 0,1 IU/ml, un nivel 10 veces superior al nivel protector pretendido. Más del 96% de los títulos antitetanos y más del 74% de los títulos antidifteria superaron un nivel de 1,0 IU/ml; no se observaron diferencias entre los grupos de inmunización.

Ejemplo 8

El presente Ejemplo describe la formulación y la inmunogenicidad de una vacuna de combinación multivalente que contenía la vacuna de polio inactivada.

(a) *Preparación de poliovirus inactivado*(i) *Cultivado en células MRC-5*

Se produjo poliovirus inactivado cultivado en célula MRC-5 de la manera siguiente. Las células procedían de células de riñón de mono verde (*Ceropithacus aethiops*).

ES 2 271 969 T3

La vacuna de poliovirus trivalente inactivada contenía componentes de tipo I (Mahoney), de tipo II (MEF) y de tipo III (Saukett), que se cultivaron en células MRC-5 en perlas microportadoras, procesadas e inactivadas separadamente previamente a la combinación en una vacuna de poliovirus trivalente.

- 5 Se añadió una suspensión de células MRC-5 al medio de cultivo celular en un fermentador a pH 7,2 (6,9 a 7,6) y temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. El medio de cultivo celular presentaba la composición siguiente:

Medio CMRL 1969

- 10 Bicarbonato sódico 0,15%
- Suero bovino adulto 5,00% a 7,00%
- 15 Sulfato de neomicina (μg de actividad) 10 IU/ml
- Polimixina B 200 IU/ml

El medio CMRL presentaba la composición siguiente:

- 20 *Polvos secos*

	Ingredientes	mg/litro
25	Aminoácido	
	L-Alanina	25,0
	L-Arginina (base libre)	58,0
	Ácido L-aspártico	30,0
30	HCl de L-cisteína	0,1
	L-cistina disódica	24,0
	Ácido L-glutámico·H ₂ O	67,0
	L-Glutamina	200,0
35	L-Glicina	50,0
	L-Histidina (base libre)	16,2
	L-Hidroxiprolina	10,0
	L-Isoleucina	20,0
40	L-Leucina	60,0
	HCl de L-lisina	70,0
	L-Metionina	15,0
	L-Fenilalanina	25,0
45	L-Prolina	40,0
	L-Serina	25,0
	L-Treonina	30,0
	L-Triptófano	10,0
50	L-Tirosina	40,0
	L-Valina	25,0
	Vitaminas	
	Ácido p-aminobenzoico	0,05
55	Ácido ascórbico	0,05
	d-Biotina	1,00
	Pantotenato cálcico	1,00
	Colina dihidrógeno citrato	2,12
60	Ácido fólico	1,00
	Glutati6n	0,05
	i-Inositol	2,00
	Nicotinamida	1,00
65	HCl de piridoxal	1,00
	Riboflavín-5-fosfato	0,10
	HCl de tiamina	1,00

ES 2 271 969 T3

(Continuación)

	Ingredientes	mg/litro
5	Componente	
	Cloruro sódico	8.000,0
	Cloruro de potasio	400,0
10	Cloruro de calcio (anhidro)	140,0
	Sulfato de magnesio·7H ₂ O	200,0
	Fosfato sódico, dibásico, anhidro	180,0
	Fosfato sódico, no básico	70,0
15	D-glucosa (anhidra)	1.000,0
	Rojo fenol	20,0
	10,852 g rinden 1 litro de medio CMRL 1969.	
20	El medio se preparó de la manera siguiente:	
	Se añadieron 450 litros de agua destilada libre de pirógenos a 905 ml de ácido hidroclicóric 1 N. A esta mezcla se añadieron 5.426,5 g de CMRL 1969 en polvo bajo agitación continua hasta su disolución formando una solución transparente. Se añadieron los compuestos químicos siguientes en el orden proporcionado, bajo agitación continua, esperando a la disolución de cada compuesto químico antes de la adición del siguiente:	
25		
	Neomicina	10 mcg/ml
	Polimixina B	200 unidades/ml
30	Solución de tampón TES	5.000,0 ml
	Bicarbonato sódico	750,0 g
	Suero bovino	30,0 l
35	Se llevó el volumen a 500 l con agua destilada fresca y se agitó hasta mezclar uniformemente.	
	Se realizó un seguimiento del cultivo celular y cuando se determinó que las células se encontraban en fase logarítmica, se descartó el medio de cultivo agotado y se sustituyó por medio de cultivo de virus. El medio de cultivo de virus presenta la composición siguiente:	
40	Compuestos químicos del medio 199 con sales de Earle	
	Bicarbonato sódico	0,26%
	Tween 80	20 ppm
	Sulfato de neomicina (μ g de actividad)	10 IU/ml
45	Polimixina B	200 IU/ml
	L-glutamina	100 mg/l
	L-arginina	29 mg/l
	L-leucina	30 mg/l
50	L-isoleucina	10 mg/l
	L-metionina	7,5 mg/l
	L-serina	12,5 mg/l
	L-treonina	15 mg/l
55	L-cistina	10 mg/l
	DiH citrato colina	107 mg/l
	El medio CMRL 0,199 presentaba la composición siguiente:	
60		
65		

ES 2 271 969 T3

Polvos secos

Ingredientes	mg/litro
5 L-Alanina	25,0
L-Arginina (base libre)	58,0
Ácido L-aspártico	30,0
HCl de L-cisteína·H ₂ O	0,1
10 L-Cistina disodio	24,0
Ácido L-glutámico·H ₂ O	67,0
L-Glutamina	100,0
Glicina	50,0
15 L-Histidina (base libre)	16,2
L-Hidroxi prolina	10,0
L-Isoleucina	20,0
L-Leucina	60,0
20 L-Lisina	70,0
L-Metionina	15,0
L-Fenilalanina	25,0
L-Prolina	40,0
25 L-Serina	25,0
L-Treonina	30,0
L-Triptófano	10,0
L-Tirosina	40,0
L-Valina	25,0
30 Ácido p-aminobenzoico	0,050
Ácido ascórbico	0,050
d-Biotina	0,010
Pantotenato de calcio	0,010
35 Dihidrógeno citrato de colina	1,060
Ácido fólico	0,010
Glutación	0,050
i-Inositol	0,050
40 Menadiona	0,010
Nicotinamida (niacinamida)	0,025
Ácido nicotínico (niacina)	0,025
HCl de piridoxal	0,025
45 HCl de piridoxina	0,025
Riboflavín-5-fosfato	0,010
HCl de tiamina	0,010
Acetato de vitamina A	0,100
50 Vitamina D (calciferol)	0,100
Vitamina E (fosfato de tocoferol)	0,010
Adenina sulfato	10,000
Adenosina trifosfato	1,000
55 Ácido adenosín-5-fosfórico	0,200
Desoxi-2-ribose	0,500
d-Ribosa	0,500
Colesterol	0,200
60 Guanina	0,300
Hipoxantina	0,300

Los cultivos se infectaron con el virus inóculo apropiado, a una multiplicidad de infección. La infección transcurrió a 36°C ± 1°C. Al completar el C.P.E. vírico, el cultivo se enfrió a una temperatura comprendida entre 2°C y 15°C.

El virus recolectado se clarificó mediante filtración. El volumen vírico recolectado se redujo mediante ultrafiltración por membrana con un corte de peso molecular nominal de 100.000 hasta un volumen adecuado para la diafiltración frente a tampón fosfato 0,04 M. Tras la diafiltración, el volumen se concentró adicionalmente hasta un volumen

ES 2 271 969 T3

adecuado para la filtración en gel. El concentrado de virus vivo se muestreó y se almacenó a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C.

5 El concentrado de virus vivo se aplicó a una columna de filtración en gel y se eluyó de la columna con tampón fosfato 0,04 M. La fracción vírica se recogió mediante seguimiento de la densidad óptica del eluido de columna a 254 nm y a 280 nm.

10 Se llevó a cabo una segunda etapa de purificación utilizando un medio de intercambio iónico DEAE con fosfato 0,04 M como tampón de elución. Esta etapa puede repetirse dos veces si la cantidad de medio de intercambio iónica utilizada resulta insuficiente según se determina mediante seguimiento a 254 nm y a 280 nm.

La fracción vírica recogida se concentró y se dializó frente a medio especial de Hank para reducir el contenido de fosfato. El medio especial de Hank presenta la composición siguiente:

15	Aminoácidos	mg/litro
	D,L-Alanina	25,00
	HCl de L-arginina	58,00
20	Ácido D,L-aspártico	30,00
	HCl de L-cisteína·H ₂ O	0,10
	2HCl de L-cistina	26,00
	Ácido D,L-glutámico	67,00
25	L-Glutamina	100,00
	Glicina	50,00
	HCl de L-histidina·H ₂ O	16,20
	L-Hidroxiprolina	10,00
30	D,L-Isoleucina	20,00
	D,L-Leucina	60,00
	HCl de L-lisina	70,00
	D,L-Metionina	15,00
	D,L-Fenilalanina	25,00
35	L-Prolina	40,00
	D,L-Serina	25,00
	D,L-Treonina	30,00
	D,L-Triptófano	10,00
40	L-Tirosina (sal disódica)	40,00
	D,L-Valina	25,00
	Vitaminas	
45	Ácido ascórbico	0,050
	d-Biotina	0,010
	Vitamina D (calciferol)	0,100
	Pantotenato de D-calcio	0,010
50	Cloruro de colina	1,060
	Ácido fólico	0,010
	i-Inositol	0,050
	Sales minerales	mg/litro
55	Cloruro de calcio (anhidro)	40,00
	Nitrato férrico·9H ₂ O	0,10
	Cloruro de potasio	400,00
	Cloruro sódico	8.000,00
60	Sulfato de magnesio·7H ₂ O	200,00
	Otros ingredientes	
	Adenina sulfato	10,000
65	Adenosín trifosfato (sal disódica)	1,000
	Ácido adenílico	0,200
	Ácido d- α -tocoferol fosfórico (sal sódica)	0,010

ES 2 271 969 T3

(Continuación)

Otros ingredientes

5	Colesterol	0,200
	Desoxirribosa	0,500
	Glucosa	1.000,000
	Glutati3n	0,050
10	HCl de guanina	0,300
	Hipoxantina (sal s3dica)	0,300
	Ribosa	0,500
	Acetato s3dico·3H ₂ O	81,500
15	Timina	0,300
	Tween 80	20,000
	Uracilo	0,300
	Xantina (sal s3dica)	0,300
20	Menadiona	0,010
	3cido nicot3nico	0,025
	Nicotinamida	0,025
	3cido p-aminobenzoico	0,050
25	HCl de piridoxal	0,025
	HCl de piridoxina	0,025
	Riboflav3n-5-fosfato	0,010
	HCl de tiamina	0,010
30	Vitamina A (acetato)	0,140

La fracci3n v3rica purificada se filtr3 a trav3s de un filtro de 0,2 μ de porosidad.

Una o m3s fracciones del concentrado v3rico purificado pueden agruparse para la inactivaci3n. Bas3ndose en los resultados del ensayo ELISA, el pool de virus monovalente se diluy3 hasta:

Tipo I: 1.750 \pm 250 DU/ml

Tipo II: 1.500 \pm 250 DU/ml y

40 Tipo III: 1.250 \pm 250 DU/ml con medio especial de Hank

El pool monovalente se calent3 hasta 37°C \pm 1°C, despu3s se filtr3 a trav3s de un filtro de 0,2 μ de porosidad.

45 Se a3adi3 la cantidad de formalina necesaria para alcanzar una concentraci3n de 1:4.000. Se mezclaron el pool v3rico y la formalina y se agitaron continuamente a 37°C \pm 1°C. Se muestre3 el pool de virus monovalente para su viabilidad. El sexto d3a, se filtr3 el pool v3rico inactivante a trav3s de un filtro de 0,2 μ y se mantuvo a 37°C \pm 1°C. El decimotercer d3a de inactivaci3n, se filtr3 el pool v3rico a trav3s de un filtro de 0,2 μ .

50 Se seleccionaron uno o m3s componentes monovalentes inactivados y se conectaron as3pticamente a un tanque de agrupamiento. El pool monovalente se concentr3 adicionalmente mediante ultrafiltraci3n de membrana, con un corte de peso molecular nominal de 100.000. Se dializ3 frente al diluyente RIV-PBS:

Hidrogenofosfato dis3dico (Na₂HPO₄), 0,346 g/CCml

55 Dihidrogenofosfato pot3sico (KH₂PO₄). Despu3s se llev3 a cabo 0,187 g/CCml con Tween para alcanzar la uniformidad del producto final.

60 Se a3adi3 alb3mina (humana) para alcanzar una concentraci3n final del 0,5%. El concentrado monovalente agrupado se filtr3 a continuaci3n a trav3s de un filtro de 0,2 μ . Se a3adi3 diluyente RIV-PBS con Tween para alcanzar una concentraci3n estimada (mediante c3lculo) de 10 a 15 dosis por cada 0,5 ml. El concentrado agrupado se almacen3 a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C hasta su utilizaci3n.

65 Se calcularon los vol3menes apropiados de componentes monovalentes de tipo I, II y III y se combinaron. El objetivo era que la vacuna trivalente contuviese:

Tipo I: 40 DU/0,5 ml de dosis

ES 2 271 969 T3

Tipo II: 8 DU/0,5 ml de dosis

Tipo III: 32 DU/0,5 ml de dosis.

5 El concentrado trivalente se almacenó a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C hasta la utilización. Se añadieron y se mezclaron formaldehído y 2-fenoxietanol. Se añadió albúmina (humana), mediante cálculo, proporcionando una concentración final del 0,5%.

(ii) Cultivado en células Vero

10 Se subcultivaron ampollas del banco de trabajo de células Vero hasta el nivel seleccionado de pases celulares. Las ampollas de células se conservaron en nitrógeno líquido. Las células se cultivaron utilizando perlas de microsoporte que eran perlas esféricas de un diámetro medio de aproximadamente 100 micrómetros, constituidas por polímeros de dextrano con radículas de DEAE injertadas en su superficie (dietilaminoetilo) que les proporcionaba una carga positiva.

15 El medio básico para el cultivo celular era el “medio esencial mínimo” (MEM) de Eagle en solución salina de Earle enriquecida con 0,2% de hidrolizado de lactalbúmina, 0,1% de dextrosa y 5% de suero bovino. Cada ml de medio contiene los antibióticos siguientes:

Estreptomicina:	75 unidades por ml
Neomicina:	14 unidades por ml
Sulfato de polimixina B:	35 unidades por ml

20 Las células Vero se subcultivaron progresivamente en biogeneradores de tamaño creciente. A continuación, se introdujo en el biogenerador industrial el medio de cultivo y el volumen suficientes de perlas de microsoporte por litro de medio. La temperatura se estabilizó a +37°C. Se añadieron las células recogidas mediante tripsinación y se sometieron a agitación. El cultivo se prolongó durante 4 a 7 días a +37°C, incrementando progresivamente la agitación. Habitualmente, al final del cultivo, se observó un incremento de 6 a 20 veces del crecimiento celular. El medio utilizado para el crecimiento vírico era medio 199 (Parker) en solución salina de Earle, enriquecida con 0,1% de dextrosa. Este medio contiene los mismos antibióticos, a la misma concentración que el medio para el crecimiento celular, pero no contiene suero bovino. El 4º/7º día de crecimiento celular, se detuvo la agitación del biogenerador en la etapa industrial, las perlas sedimentaron en el fondo del tanque y se separó el medio viejo. A continuación, se introdujo algo de medio 199 libre de suero en cada biogenerador y se agitó. Seguidamente, se extrajo este medio, llevando a cabo el lavado de las perlas y de las células. Se transfirió algo de medio 199 libre de suero al biogenerador junto con el volumen necesario de lote inóculo. El virus se adsorbió a las células mediante agitación suave. Al final del cultivo vírico, se detuvo la agitación. Se extrajo y se recogió la suspensión vírica y las perlas se retuvieron mediante filtración. Se homogeneizó la suspensión vírica. Lo recolectado, filtrado en una membrana orgánica de poros de tamaño intermedio de 0,2 mm se almacenó a +4°C. El virus se concentró mediante ultrafiltración.

25 El virus se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando DEAE-dextrano-soporte Spherosil, equilibrado con tampón fosfato 0,04 M, pH = 7,00. El virus se purificó adicionalmente mediante cromatografía de filtración en gel utilizando una columna que contenía un gel de agarosa, Sepharosis CL-6B taponado con fosfato 0,04 M, pH = 7,00. El virus se purificó adicionalmente mediante cromatografía utilizando DEAE-dextrano-Spherosil taponado con un tampón fosfato 0,04 M, pH = 7,00. Inmediatamente después de la realización de la última purificación, se ajustó la suspensión vírica al volumen requerido con algo de medio M-199, pH = 7,0 sin fosfato, se concentró diez veces en EDTA 5 mm, glicina al 0,5% y Tween 80, hasta una concentración final de 50 mg/litro (medio de inactivación). Esta mezcla constituyó la “mezcla vírica concentrada” y se filtró por una membrana de 0,2 µm. La suspensión vírica concentrada se almacenó a +4°C hasta que se llevase a cabo la inactivación.

30 Se mezclaron uno o más lotes de “mezcla vírica concentrada” del mismo tipo y posiblemente se diluyeron o se ajustaron con algo de “medio de inactivación” en un tanque adecuado. La dilución se ajustó al volumen correcto según el tipo con el fin de obtener un título de antígeno D de entre:

- 35
- 1.500 y 2.000 unidades de D en el tipo 1,
 - 800 y 1.000 unidades de D en el tipo 2,
 - 40 - 1.000 y 1.500 unidades de D en el tipo 3

y una tasa de proteínas de:

- 45
- ≤ 40 µg/ml en el tipo 1,
 - 50 - ≤ 70 µg/ml en el tipo 2,
 - ≤ 30 µg/ml en el tipo 3.

ES 2 271 969 T3

La suspensión vírica concentrada purificada ajustada se filtró por una membrana de 0,22 μm como máximo 72 horas antes del inicio de la inactivación. A continuación, la suspensión vírica se calentó nuevamente hasta +37°C. Para la inactivación, se añadió solución de formaldehído hasta obtener una concentración de 1/4.000. Con el fin de seguir la cinética de la inactivación tras 24, 48, 72 y 96 horas, se extrajeron muestras a lo largo de los primeros cuatro días. Se llevó a cabo un muestreo de 10 ml con neutralización inmediata del formaldehído mediante la acción de bisulfito sódico y almacenamiento directo a -20°C hasta que se llevase a cabo la titulación.

El sexto día, se filtró la suspensión vírica durante la inactivación utilizando un filtro de 0,22 μm . Tras la filtración, se prolongó la incubación del líquido a +37°C durante 6 días más bajo agitación constante. El noveno día de inactivación, se extrajeron 3 veces el volumen correspondiente a 3.000 dosis humanas y 500 ml como mínimo de la recolección individual cruda. Este volumen se calculó de acuerdo con el título de antígeno D de la "mezcla vírica concentrada". El muestreo se neutralizó directamente con algo de bisulfito sódico para detener la acción del formaldehído residual. A continuación se extrajo la suspensión vírica homogeneizada e inactivada del incubador a +37°C tras 12 días de inactivación. El volumen se neutralizó directamente con algo de bisulfito sódico y se almacenó a +4°C.

Para preparar un lote trivalente de IPV se combinaron preparaciones monovalentes que proporcionasen:

de tipo 1 (Mahoney) 400 unidades de antígeno D

de tipo 2 (MEF-1) 80 unidades de antígeno D

de tipo 3 (Saukett) 320 unidades de antígeno D

Medio 199: pH 7,2, c.s. para 1 ml. La mezcla se agitó para homogeneizar y se filtró por una membrana de 0,22 micrómetros de porosidad.

El producto a granel final se obtuvo a partir de los lotes a granel trivalentes concentrados, tales como los descritos, mediante dilución con medio 199, pH 7,2, sin rojo de fenol, de manera que la dosis unitaria contuviese, por cada 0,5 ml:

40 unidades de antígeno D para el tipo 1

8 unidades de antígeno D para el tipo 2

32 unidades de antígeno D para el tipo 3

(b) Formulaciones

Una formulación de vacuna multivalente (APDT) contenía cinco antígenos de pertussis (10 μg de PT, 5 μg de FHA, 5 μg de FIM 2 y 3, 3 μg de 69K), 15 Lf de toxoide diftérico, 5 Lf de toxoide tetánico, 1,5 mg de fosfato de aluminio como adyuvante y 2-fenoxietanol al 0,6% como conservante por cada 0,5 ml (CLÁSICA). La vacuna se utilizó sola o en combinación con IPV producido en células MRC-5 (mIPV) preparado tal como se ha descrito anteriormente, IPV producido en células Vero (vIPV) preparado tal como se ha descrito anteriormente, o con OPV (Connaught Laboratories Limited). Con el fin de no alterar el programa de inmunización rutinaria, se administró vacuna conjugada con toxoide tetánico de *Haemophilus influenzae* b, al producirse la visita de seguimiento.

Población

Se incluyeron en el estudio niños sanos de 17 a 19 meses de edad que habían sido inmunizados con tres dosis de DTP y con 2 dosis de OPV, o con 3 dosis de DTP-IPV previamente a los 8 meses de edad. Tras obtener el consentimiento informado por escrito de los progenitores o cuidadores, los niños se asignaron mediante una lista ponderada de números aleatorios generado por ordenador para recibir uno de entre cinco regímenes de vacunación (Tabla 10). Las vacunas de combinación que contenían A3DT se administraron por la vía intramuscular con una aguja de 25 mm en el músculo deltoides del brazo o en el músculo *vastus lateralis* del muslo si el deltoides era de masa insuficiente. Las IPV (0,5 ml; mIPV o vIPV) proporcionadas solas se administraron por la vía subcutánea utilizando una aguja de 1/2 a 5/8 pulgadas (12,5 a 16 mm) de longitud. Las vacunas que contenían APDT se proporcionaron en el lado izquierdo; el lado derecho se utilizó para las vacunas de poliovirus inactivado cuando se proporcionó separadamente, y para todas las vacunas conjugadas de *Haemophilus influenzae* b durante la segunda visita.

Seguimiento clínico y de laboratorio

Se recogieron muestras sanguíneas mediante venipunción o pinchazo en el dedo previamente a la inmunización y 28 días después de la misma. Se midieron los anticuerpos IgG contra PT mediante inmunoensayo enzimático y los anticuerpos neutralizantes de PT mediante neutralización de CHO. Se midieron los anticuerpos IgG anti-FHA, anti-FIM y anti-69K mediante inmunoensayo enzimático; las unidades se calcularon utilizando antisuero de referencia de la US FDA (nº 3). También se midieron las aglutininas de pertussis. Se midió la antitoxina diftérica mediante ensayo de microneutralización y la antitoxina tetánica mediante inmunoensayo. Se midieron los anticuerpos contra los poliovirus de tipo 1, 2 y 3 se midieron mediante neutralización vírica. Los títulos de anticuerpos se expresaron como

medias geométricas de títulos; las muestras séricas con títulos inferiores al límite de detección experimental fueron asignados un valor de una mitad del límite inferior de detección para los cálculos estadísticos.

5 Las medias geométricas de títulos de anticuerpos y los intervalos de confianza del 95% se calcularon para el título de anticuerpos contra cada antígeno de vacuna antes y después de la inmunización. Se compararon las medias de los logaritmos de los títulos y la media de los incrementos logarítmicos de títulos de anticuerpo mediante análisis de perfiles y análisis de la varianza. Se comparó mediante regresión logística la proporción de sujetos que alcanzaba niveles preespecificados en cada grupo. Las comparaciones se realizaron entre cada vacuna de poliovirus administrada separadamente o como inyección combinada, entre mIPV y vIPV (tanto separada como combinadamente) y entre las vacunas combinadas IPV y OPV. No se realizaron correcciones para comparaciones múltiples.

15 Se incluyó en el estudio un total de 425 niños (52% niñas), que recibió la inmunización de refuerzo (Tabla 10). La media de edad de inclusión en el estudio era de 17,8 meses (intervalo de 17,0 a 20,0). Se obtuvieron especímenes de suero posteriores a la inmunización de 422 participantes (99,3%) una media de 29,2 días después de la inmunización (intervalo de 28 a 41 días). Los sucesos adversos clasificados como severos fueron poco frecuentes durante el estudio.

20 Antes de la inmunización, los niveles de anticuerpos eran equivalentes en los grupos para la mayoría de los antígenos. Las excepciones fueron que los participantes asignados a recibir APDT y mIPV como inyecciones separadas presentaron niveles de anticuerpos anti-FIM, aglutinina, antidifteria y antitétanos significativamente más bajos que los grupos asignados para recibir la vacuna combinada APDT-mIPV. De manera similar, el grupo asignado aleatoriamente a recibir inyecciones separadas de APDT y vIPV presentó niveles de anticuerpos antitétanos inferiores que el grupo a punto de recibir la vacuna combinada APDT-vIPV.

25 Tras la inmunización, se produjo un incremento significativo de anticuerpos en todos los grupos de vacunación contra todos los antígenos incluidos en las vacunas. Se produjeron pocas diferencias en la respuesta de anticuerpos contra los antígenos de pertussis dependiendo del grupo de vacuna polio. No se observaron diferencias en los anticuerpos anti-PT según el inóculo enzimático o la neutralización de CHO o de los anticuerpos anti-FHA. Los anticuerpos anti-69K fueron significativamente más altos en el grupo que recibió la vacuna mIPV combinada con APDT (77,7 unidades) que el grupo que recibió mIPV en forma de inyección separada (37,9 unidades; $p < 0,001$) o que el grupo que recibió OPV (47,7; $p < 0,05$). Los anticuerpos anti-FIM y las aglutininas también fueron superiores en el grupo al que se administró la vacuna combinada APDT-mIPV que el grupo que recibió inyecciones separadas; sin embargo, también se detectaron estas mismas diferencias en los sueros previamente a la inmunización.

35 Se detectaron diferencias en las respuestas de anticuerpos anti-poliovirus. Tanto APDT-mIPV como APDT-vIPV indujeron niveles de anticuerpos anti-poliovirus tipo 1 y tipo 3 más altos ($P < 0,001$ para todas las comparaciones). Los niveles de anticuerpos anti-poliovirus tipo 2 también fueron superiores tras la vacunación con APDT-mIPV (10.633, dilución recíproca) y APDT-vIPV (10.256) que OPV (7.185); sin embargo, estas diferencias sólo alcanzaron la significancia estadística en el caso de APDT-mIPV ($p < 0,05$). Los títulos de anticuerpos antipoliovirus alcanzados con la vacuna combinada APDT-MIPV también fueron superiores que cuando se administró mIPV en forma de inyección separada (6620-1, $p < 0,05$).

45 Los títulos de anticuerpos antitétanos fueron más elevados en los receptores de OPV que en cualquiera de las combinaciones de IPV ($p < 0,05$). Los títulos antidifteria también fueron superiores en los receptores de OPV, aunque las diferencias sólo alcanzaron la significancia estadística en la comparación con el grupo APDT-vIPV ($p < 0,05$). Tras la inmunización, todos los niños presentaban niveles de anticuerpos contra la difteria y contra el tétanos superiores a 0,01 IU/ml y todos los niños excepto uno presentaban niveles superiores a 0,1 IU/ml.

50 Los resultados de este estudio demuestran que una vacuna de componente pertussis que contiene PT, FHA, 69K y FIM en combinación con toxoides diftérico y tetánico también puede combinarse con vacuna de poliovirus inactivado sin producir un incremento significativo de la reactogenicidad ni pérdida de inmunogenicidad. En contraste con los resultados con la DTP de células completas, no se produjo ninguna disminución de las respuestas de anticuerpos a los antígenos de *Bordetella pertussis*. No se produjeron diferencias sustantivas entre las vacunas de IPV preparadas en las líneas celulares MRC-5 o Vero; ambas vacunas indujeron niveles en suero de anticuerpos antipoliovirus más altos que OPV. La demostración de la equivalencia de mIPV y vIPV facilita la implementación de la vacuna de pertussis acelular en jurisdicciones con una preferencia por una IPV derivada de una línea celular particular.

60 En conclusión, los experimentos de los que se informa en el presente Ejemplo demuestran que una vacuna de pertussis acelular de cinco componentes puede combinarse con seguridad con cualquiera de entre dos vacunas IPV para la cuarta dosis de vacunación entre los meses 17° y 19° de edad.

Sumario de la exposición

65 A título de sumario de la presente exposición, la presente invención, que se define a partir de las reivindicaciones adjuntas, proporciona nuevas preparaciones de antígenos de *Bordetella* y no de *Bordetella* para producir vacunas de pertussis multicomponentes. Estas vacunas son seguras, no reactogénicas, inmunogénicas y protectoras en el ser humano.

Tabla 1. Vacunas de pertussis acelulare

Vacuna	PT	Agente de formación de toxoide	HA	.69	GG2	GG3	Referencia
AMVC	+	H ₂ O ₂ ^a	-	-	-	-	62
PHL ^b en masa	+	TMN ^c	-	-	-	-	63
Instituto Mérieux	+	GI ^d	+	-	-	-	64
Smith-Kline	+	FI ^e /GI FI/GI	+	-	-	-	32 32
CAMR ^f	+	FI	+	-	+	+	65
Lederle/Takeda	+	FI	+	+	+	-	66
Connaught	+	GI	+	-	+	+	32
	+	GI	+	+	+	+	67

a Inactivado con peróxido de hidrógeno

b Massachusetts Public Health Laboratories

c TNM, inactivado con tetranitrometano

d GI, inactivado con glutaraldehido

e FI, inactivado con formalina

f Centre for Applied Microbiology and Research

Tabla 2

Respuestas de anticuerpos IgG contra el antígeno de pertussis y los toxoides diftérico y tetánico en adultos y en niños pequeños tras la inmunización con placebo o con toxoides pertussis acelular (AP), diftérico-tetánico-pertussis (DTP) o DTP acelular multicomponente (ADTP).

	Adultos		Niños		Después de la inmunización		
	Antes de la inmunización	Después de la inmunización, día 28	Antes de la inmunización	Después de la inmunización	ADTP CP _{10/10/5/3} DT	DTP	
	Placebo	AP PC _{10/5/5/3}	AP CP _{10/5/5/3}	DTP	ADTP CP _{10/10/5/3} DT	DTP	
Toxide pertussis	16,45 (9,46-28,62)	22,78 (12,11-42,86)	415,87 (243,91-709,09)	43,71 (14,29-133,88)	15,45 (8,50-28,10)	221,32 (99,83-490,67)	ADTP CP _{10/10/5/3} DT 306,55 (155,84-603,03)
Hemaglutinina filamentososa	15,24 (10,28-22,60)	23,59 (15,59-35,69)	317,37* (243,05-141,41)	2,93 (1,81-4,73)	3,86 (3,03-4,93)	30,06 (11,82-76,46)	29,86 (16,51-53,99)
Agglutinógenos	21,26 (12,14-37,23)	28,64 (12,20-67,21)	2.048,00 (1.025,62-4.089,55)	26,72 (16,94-42,15)	29,24 (13,67-62,75)	315,2 (127,4-779,9)	1.243,3 (594,8-2.603,5)
Pertactina	7,89 (4,00-15,56)	11,47 (6,41-20,55)	855,13 (396,41-1.844,67)	6,54 (2,79-15,33)	9,45 (5,50-16,23)	60,13 (24,59-147,04)	116,16 (57,87-233,19)
Ensayo de neutralización de células CHO	12,30 (6,97-21,68)	21,11 (10,35-43,06)	604,67 (403,82-405,41)	27,47 (7,36-102,62)	9,71 (4,71-20,03)	270,60 (24,6-1.100,8)	342,51 (146,6-800,2)
Toxide diftérico	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	8,75 (6,52-23,92)	9,65 (5,62-16,57)
Toxide tetánico	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	4,11 (3,20-5,28)	6,32 (5,31-7,53)
n° estudiado	16	15	15	10	25	12	¿?

TABLA 3

Resultados serológicos de las vacunas de componentes pertussis en niños (2, 4 y 6 meses de edad)

Ensayo clínico	Medias geométricas de títulos										
	Producto	Estudio	Número de participantes	PT	FHA	69 kDa	Aglutinógenos fimbriales	Neutralización n de células CHO	Aglutinación	Tet	Dip
1	CP _{10/15/3} DT CP _{10/15/3} DT Células completas (Mass.) Células completas (Lederle)	NIAID (U.S.)* Multicentro Estudio comparativo (Ciclo I)	108 113 95 312	38 36 20 67	37 36 51 3	3 113 101 64	229 241 70 193	160 150 80 270	85 73 42 84	7,8 5,0 - -	0,8 0,4 - -
2	CP _{10/15/3} DT Células completas (CLL)	Fase II Canadá	315 101	87,1 20	50,2 4,7	29,9 6,4	239,8 603,2	29,6 2,6	- -	1,5 1,2	0,3 0,4
3	CP _{10/15/3} DT CP _{20/20/5/3} DT Células completas (CLL)	Fase IIB Canadá	32 33 30	58,4 133,3 10,4	45,2 95,0 8,9	40,6 37,1 6,8	111,4 203,8 393,9	32,7 82,4 4,0	-	1,0 1,1 1,8	0,14 0,21 0,31
4	CP _{10/15/3} DT CP _{20/20/5/3} DT	Fase IIC Canadá	42 250	105,1 101,6	82,5 163,9	71,1 87,6	358,6 220,6	66,9 68,7	307,0 219,2	2,0 1,8	0,33 0,38
5	CP _{20/20/5/3} DT Células completas (CLL)	Montréal Estudio de viabilidad	58 58	212,7 101,4	83,4 11,7	106,3 16,8	601,9 906,9	109,6 6,0	-	1,9 1,1	0,53 0,27
6	CP _{10/15/3} DT CP _{20/20/5/3} DT Células completas (CLI) Células completas (Lederle)	NIAID (U.S.) Estudio comparativo (Ciclo II)	80 80 80 80	42 39 2 18	34 87 3 2	50 43 9 16	310 184 33 129	196 254 54 137	185 137 167 86		

CLI - Connaught Laboratories Incorporated, Swiftwater, Pennsylvania

Mass. - Massachusetts Public Laboratories.

CLL - Connaught Laboratories Limited, Willowdale, Ontario

Lederle - Lederle Laboratories Inc.

ES 2 271 969 T3

TABLA 4

Eficacia de las vacunas de pertussis acelulares

Vacuna	Eficacia (%)	
	A	B
CP _{10/5/5/3} DT	84,7 (80,3→88,5) ¹	77
PT ₂₅ :FHA ₂₅ DT	58 (49,8→64,8) ¹	
DPT ²	47,9 (37,1→56,9) ¹	

A: definición de caso: tos espasmódica de 21 días y positivo en cultivo

B: definición de caso: tos de pertussis leve de por lo menos un día

Nota 1: límites de confianza

Nota: vacuna de pertussis de células completas

TABLA 5

VACUNA	N	GMT (IC AL 95%)	% ≥ 0,15	% ≥ 1,0
HCPDT-vIPV-PRP-T (líquido)	327	4,76 (4,12-5,50)	97,9	88,4
HCPDT-mIPV para reconstituir PRP-T	322	4,37 (3,74-5,09)	98,4	84,5
HCPDT-mIPV y PRP-T (separados)	108	3,83 (3,05-4,80)	100	88,9
DPT-IPV para reconstituir PRP-T	105	3,84 (2,90-5,07)	97,1	81,0

TABLA 6

VACUNA	N	POLIO 1	POLIO 2	POLIO 3
HCPDT-vIPV-PRP-T (líquido)	328	624 (533-732)	2.397 (2.043-2.814)	1.268 (1.082-1.485)
HCPDT-mIPV para reconstituir PRP-T	323	718 (589-875)	2.173 (1.837-2.570)	1.938 (1.640-2.291)
HCPDT-mIPV y PRP-T (separados)	108	702 (513-960)	2.595 (2.005-3.360)	1.837 (1.362-2.477)
DPT-IPV para reconstituir PRP-T	105	889 (630-1.255)	2.597 (2.000-3.373)	2.726 (2.108-3.525)

TABLA 7

ANTÍGENO	HCPDT-vIPV- PRP-T (líquido) (n=324)	HCPDT-mIPV para reconstituir PRP-T (n=322)	HCPDT-mIPV y PRP-T (separados) (n=108)	DPT-mIPV para reconstituir PRP-5 (n=105)
PT	86,7 (80,9-93,0)	89,1 (82,5-96,1)	102,6 (90,5-116,4)	15,2 (12,2-19,0)
FHA	155,7 (147,2-164,7)	152,5 (143,6-162,0)	165,3 (148,4-184,3)	31,4 (27,2-36,2)
FIM	276,2 (242,2-315,1)	244,5 (211,4-282,7)	355,0 (279,4-451,1)	332,3 (264,6-417,3)
Pertactina	55,2 (48,7-62,5)	56,0 (49,4-63,4)	40,5 (33,0-49,7)	8,9 (6,8-11,7)
DIPH	0,29 (0,25-0,33)	0,28 (0,24-0,33)	0,36 (0,28-0,46)	0,29 (0,22-0,38)
TET	1,09 (1,00-1,19)	0,88 (0,80-0,96)	1,61 (1,40-1,86)	0,63 (0,51-0,78)

TABLA 8

ANTÍGENO	HCPDT-vIPV 1 inyección (n=85)	HCPDT+vIPV 2 inyecciones (n=84)	HCPDT-mIPV 1 inyección (n=87)	HCPDT+mIPV 2 inyecciones (n=81)	HCPDT+OPV HÍBRIDA+OPV (n=85)
Difteria	4,1	4,57	4,99	3,89	6,19
Tétanos	3,17	3,13	3,25	3,31	4,02
PT	73,9	68,2	80,5	65,2	86,8
FHA	93,9	98,1	112,8	117,8	120,9
Pertactina	63,8	45,1	77,7	37,9	47,7
FIM	922,7	809,1	1.210	753,3	1.215
Agglutininas	1.278	1.285	1.606	1.040	1.532
Polio tipo 1	6.672	5.681	10.242	8.784	2.110
Polio tipo 2	10.256	7.861	10.633	6.620	7.185
Polio tipo 3	5.771	7.781	6.798	8.541	556,3

ES 2 271 969 T3

TABLA 9

5
10
15
20
25
30

Combinación de PRP-T con vacuna de componente pertussis cuando se administra combinada o separada en el mismo día o en días separados CP _{10/5/5/3} CT (CLÁSICA) y CP _{20/20/5/3} DT (HÍBRIDA) a los 19 meses (1 mes después)			
ANTÍGENO	Clásica/híbrida para reconstituir PRP-T, inyección única (n=181)	Clásica/Híbrida y PRP-T, inyecciones separadas el mismo día (n=181)	Clásica/Híbrida y PRP-T, inyecciones separadas en días separados (n=180)
anti-PRP	59,3	60,8	32,4
Difteria	3,7	3,3	2,4
Tétanos	5,0	6,6	5,3
PT	120	114	96,1
CHO	195	189	136
FHA	102	99,3	87,5
Pertactina	187	223	168
FIM	430	434	315
Agglutininas	1.004	1.033	682
Nota: los valores con las mismas letras eran significativamente diferentes (p ≤ 0,05)			

Referencias

- 35 1. Muller, A.S. Leeuwenburg, J. and Pratt, D.S. (1986) Pertussis: epidemiology and control. *Bull WHO* 64: 321-331.
- 40 2. Fine, P.E.M. and Clarkson, J.A. (1984). Distribution of immunity to pertussis in the population of England and Wales. *J. Hyg.* 92:21-26.
3. Mortimer, E.A. Jr. (1990). Pertussis and its prevention: a family affair. *J. Infect. Dis.* 161: 473-479.
4. Addiss, D.G., Davis, I.P., Meade, B.D., Burstyn, D.G. Meissner, M., Zastrow, J.A., Berg, J.L., Drinka, P., and Phillips, R. (1991). A pertussis outbreak in a Wisconsin nursing home. *J. Infect. Dis.* 164: 704-710.
- 45 5. Halperin, S.A. and Marrie, T.J. (1991a). Pertussis encephalopathy in an adult: case report and review. *Rev. Infect. Dis.* 13: 1043-1047.
- 50 6. Onorato, I.M., Wassilak, S.G. and Meade, B. (1992). Efficacy of whole-cell pertussis vaccine in preschool children in the United States. *JAMA* 267: 2745-2749.
7. Miller, D.L., Ross, E.M., Alderslade, R., Bellman, M.H., and Brawson, N.S.B. (1981). Pertussis immunization and serious acute neurological illness in children. *Brit Med. J.* 282: 1595-1599.
- 55 8. Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M., and Ishii, S. (1982). Subunit structure of islet-activating protein. pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 21: 5516-5522.
9. Tuomanen, E. and Weiss, A. (1985). Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 152:118-125.
- 60 10. Friedman, R-L., Nordensson, K., Wilson, L., Akporiaye, E.T., and Yocum D.E. (1992). Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* 60: 4578-4585.
- 65 11. Pittman, M (1979). Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. *Rev. Infect. Dis.*, 1: 401-402.
12. Granstrom, M. and Granstrom G. (1993). Serological correlates in whooping cough. *Vaccine* 11:445-448.

13. **Gearing**, A.J.H., **Bird**, C.R., **Redhead**, K., and **Thomas**, M. (1989). Human cellular immune responses to *Bordetella pertussis* infection. *FEMS Microbiol. Immunol.* 47: 205-212.
14. **Thomas**, M.G., **Redhead**, K., and **Lambert**, H.P. (1989a). Human serum antibody responses to *Bordetella pertussis* infection and pertussis vaccination. *J. Infect. Dis.* 159: 211-218.
15. **Thomas**, M.G., **Ashworth**, L.A.E., **Miller**, E., and **Lambert**, H.P. (1989b). Serum IgG, IgA, and IgM responses to pertussis toxin, filamentous haemagglutinin, and agglutinogens 2 and 3 after infection with *Bordetella pertussis* and immunization with whole-cell pertussis vaccine. *J. Infect. Dis.* 160: 838-845.
16. **Tomoda**, T., **Ogura**, H., and **Kurashige**, T. (1991). Immune responses to *Bordetella pertussis* infection and vaccination. *J. Infect. Dis.* 163: 559-563.
17. **Petersen**, J.W., **Ibsen**, P.H., **Haslov**, K., **Capiiau**, C., and **Heron**, I. (1992a). Proliferative responses and gamma interferon and tumor necrosis factor production by lymphocytes isolated from tracheobronchial lymph nodes and spleens of mice aerosol infected with *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 60: 4563-4570.
18. **Englund**, J.A., **Reed**, G.F., **Edwards**, K.M., **Decker**, D., **Pichichero**, M.E., **Ronnels**, M.B., **Steinhoff**, M.C., **Anderson**, E.L., **Meade**, B.D., **Deloria**, M.A., and the NIAID Acellular Pertussis Vaccine Group. (1992b). Effect of transplacental antibody and development of pertussis toxin (PT) and filamentous haemagglutinin (FHA) antibody after acellular (AC) and whole cell (WC) pertussis vaccines in infants. *Pediatr. Res.* 31:91A.
19. **Oda**, M., **Cowell**, J.L., **Burstyn**, D.G., **Thaib**, S., and **Manclark**, C.R. (1985). Antibodies to *Bordetella pertussis* in human colostrum and their protective activity against aerosol infection of mice. *Infect. Immun.* 47:441-445.
20. **Petersen**, J.W., **Bentzon**, M.W., **Capiiau**, C., and **Heron**, I. (1991). The cell mediated and humoral immune response to vaccination with acellular and whole cell pertussis vaccine in adult humans. *FEMS Microbiol Lett.* 76:279-288.
21. **Oda**, M., **Cowell**, J.L., **Burstyn**, D.G., and **Manclark**, C.R. (1984). Protective activities of the filamentous haemagglutinin and the lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis* in mice. *J. Infect. Dis.* 150: 823-833.
22. **Sato**, H., **Ito**, A., **Chiba**, J. and **Sato**, Y. (1984b). Monoclonal antibody against pertussis toxin: effect on toxin activity and pertussis infections. *Infect. Immun.* 46: 422-428.
23. **Sato**, H. and **Sato**, Y. (1990). Protective activities in mice of monoclonal antibodies against pertussis toxin. *Infect. Immun.* 58: 3369-3374.
24. **Weiss**, A.A. and **Hewlett**, E.L. (1986). Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Ann. Rev. Microbiol* 40: 661-668.
25. **Munoz**, J.J. (1988). Action of pertussigen (pertussis toxin) on the host immune system. In: *Pathogenesis and Immunity in Pertussis*. A.C. Wardlaw and R. Parton, eds., John Wiley & Sons Ltd., Toronto. pp. 211-229.
26. **Watkins**, P.A., **Burns**, D.L., **Kanaho**, Y., **Liu**, T-Y., **Hewlett** E.L., and **Moss**, J. (1985). ADP-ribosylation of transducin by pertussis toxin. *J. Biol. Chem.* 260: 13478-13482.
27. **Burns**, D.L., **Kenimer**, J.G., and **Manclark**, C.R. (1987). Role of the A subunit of pertussis toxin in alteration of Chinese hamster ovary cell morphology. *Infect. Immun.*, 55: 24-28.
28. **Munoz**, J.J., **Arai**, H., and **Cole**, R.L. (1981). Mouse-protecting and histamine-sensitizing activities of pertussigen and fimbrial hemagglutinins from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 32: 243-250.
29. **Relman**, D.A., **Domenighini**, M., **Tuomanen**, E., **Rappuoli**, R., and **Falkow**, S. (1989). Filamentous haemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2637-2641.
30. **Di Tommaso**, A., **Domenighini**, M., **Bugnoli**, M., **Tagliabuc**, A., **Rappuoli**, R., and **De Magistris**, M.T. (1991). Identification of subregions of *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin that stimulate human T-cell responses. *Infect. Immun.* 59: 3313-3315.
31. **Tomoda**, T., **Ogura**, H., and **Kurashige**, T. (1992). The longevity of the immune response to filamentous haemagglutinin and pertussis toxin in patients with pertussis in a semiclosed community. *J. Infect. Dis.* 166: 908-910.
32. **Edwards**, K.M., **Meade**, B.D., **Decker**, M.D., **Reed**, G.F., **Rennels**, M.B., **Steinhoff**, M.C., **Anderson**, E.L., **Englund**, J.A., **Pichichero**, M.E., **Deloria**, M.A., **Deforest**, A., and the NIAID Acellular Pertussis Vaccine Study Group (1992). Comparison of thirteen acellular pertussis vaccines: serological response. *Pediatr. Res.* 31:91A.

33. **Kimura, A., Mountzoutos, K.T., Relman, D.A., Falkow, S., and Cowell, J.L. (1990a).** *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect. Immun.* 58:7-16.
- 5 34. **Shahin, R.D., Amsbaugh, D.F., and Leef, M.F. (1992).** Mucosal immunization with filamentous haemagglutinin protects against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect. Immun.* 60: 1482-1488.
35. **Montaraz, J.A., Novotny, P. and Ivanyi, J. (1985).** Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 161: 581-582.
- 10 36. **Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J.G., Charles, I.G., Fairweather, M., Novotny, P., and Brennan, M.J (1991).** Pertactin, and Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 345-349.
- 15 37. **De Magistris, T., Romano, M., Nuti, S., Rappuoli, R. and Tagliabue, A. (1988).** Dissecting human T responses against *Bordetella* species *J. Exp. Med.* 168: 1351-1362.
38. **Seddon, P.C., Novotny, P., Hall, C.A., and Smith, C.S. (1990).** Systemic and mucosal antibody response to *Bordetella pertussis* antigens in children with whooping cough. *Serodiagnosis Immunother. Inf. Dis.* 3: 337-343.
- 20 39. **Podda, A., Nencioni, L., Marsili, I., Peppoloni, S., Volpini, G., Donati, D., Di Tommaso, A., De Magistris, M.T., and Rappuoli, R. (1991).** Phase I clinical trial of an acellular pertussis vaccine composed of genetically detoxified pertussis toxin combined with FHA and 69 kDa. *Vaccine* 9: 741-745.
- 25 40. **Roberts, M., Tite, J.P., Fairweather, N.F., Dougan, G. and Charles, I.G. (1992).** Recombinant P.69/pertactin: immunogenicity and protection of mice against *Bordetella pertussis* infection. *Vaccine* 10: 43-48.
41. **Novotny, P., Chubb, A.P., Cownley, K., and Charles, I.G. (1991).** Biological and protective properties of the 69kDa outer membrane protein of *Bordetella pertussis*: a novel formulation for an acellular vaccine. *J. Infect. Dis.* 30 164: 114-122.
42. **Shahin, R. D., Brennan, M.J., Li, Z.M., Meade, B.D., and Manclark, C.R. (1990b).** Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69kD outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.* 171:63-73.
- 35 43. **Robinson, A., Irons, L.I., and Ashworth, L.A.E. (1985a).** *Pertussis vaccine*: present status and future prospects. *Vaccine* 3: 11-22.
44. **Robinson, A., Ashworth, L.A.E. Baskerville, A., and Irons, L.I. (1985b).** Protection against intranasal infection of mice with *Bordetella pertussis*. *Develop. Biol. Stand.* 61: 165-172.
- 45 45. **Robinson, A., Gorridge, A.R., Funnell, S.G.P., and Fernandez, M. (1989b).** Serospecific protection of mice against infection with *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 7: 321-324.
46. **Sato, Y., Kimura, M., and Fukumi, H. (1984a).** Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* i: 122-126.
47. **Kimura, M. (1991).** Japanese clinical experiences with acellular pertussis vaccines. *Develop. Biol. Standard.* 50 73: 5-9.
48. **Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines (1988).** Placebo-controlled trial of two acellular vaccines in Sweden-protective efficacy and adverse effects. *Lancet* i:955-960.
49. **Olin, P., Storsaeter, J., and Romanus, V. (1989).** The efficacy of acellular pertussis vaccine. *JAMA* 261:560.
- 55 50. **Storsaeter, J., Hallander, H., Farrington, C.P., Olin, P., Moliby, R., and Miller, E. (1990).** Secondary analyses of the efficacy of two acellular pertussis vaccines evaluated in a Swedish phase III trial. *Vaccine* 8: 457-462.
51. **Storsaeter, J., and Olin, P. (1992).** Relative efficacy of two acellular pertussis vaccines during three years of passive surveillance. *Vaccine*: 10: 142-144.
- 60 52. **Tan, L.U.T., Fahim R.E.F., Jackson, G., Phillips, K., Wah, P., Alkema, D., Zobrist, G., Herbert, A., Boux, L., Chong, P., Harjee, N., Klein, M., and Vose, J. (1991).** A novel process for preparing an acellular pertussis vaccine composed of non-pyrogenic toxoids of pertussis toxin and filamentous haemagglutinin. *Molec. Immunol.* 28:251-255.
- 65 53. **Sekura, R.D., Zhang, Y., Roberson, R., Acton, B., Trollfors, B., Tolson, N., Siloach, J., Bryla, D., Muir-Nash, J., Koeller, D., Schneerson, R., and Robbins, J.B. (1988).** Clinical, metabolic, and antibody responses of adult

ES 2 271 969 T3

- volunteers to an investigation vaccine composed of pertussis toxin inactivated by hydrogen peroxide. *J. Pediatr.* 113: 807-813.
54. **Winberry, L., Walker, R., Cohen, N., Todd, C., Sentissi, A., and Siber, G. (1988).** Evaluation of a new method for inactivating pertussis toxin with tetranitromethane. International Workshop on *Bordetella pertussis*, Rocky Mountain Laboratories, Hamilton, Montana.
55. **Sekura, R.D. et al. (1993),** *J. Biol. Chem.* 258: 14647-14651.
56. **Irons, L.I. et al. (1979),** *Biochem. Biophys. Acta* 580: 175-185.
57. **Munoz, J.J. et al. (1981).** *Infect. Immun.* 33: 820-826.
58. **Cowell, J.L. et al. (1980),** Seminar on *Infectious Diseases* 4: 371-379.
59. **Selmer, J.C. (1984)** *Acta Path. Microbial. Immunol. Scand. Sect. C*, 92: 279-284.
60. **Lockhoff, O. (1991)** Glycolipids as Immunomodulators: Synthesis and Properties, *Chem. Int. Ed. Engl.* 30: 1611-1620.
61. **Nixon-George, A., Moran, T., Dionne, G., Penney, C.L., Lafleur, D., Bona, C.A. (1990)** The adjuvant effect of stearyl tyrosine on a recombinant subunit hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 144: 4798-4802.
62. **Siber, G.R., Thakrar, N., Yancey, B.A., Herzog, L., Todd, C., Cohen, N., Sekura, R.D., Lowe, C.U. (1991).** Safety and immunogenicity of hydrogen peroxide-inactivated pertussis toxoid in 18-month-old children. *Vaccine* 9: 735-740.
63. **Siber, G., Winberry, L., Todd, C., Samore, M., Sentissi, A., and Cohen, N. (1988).** Safety and immunogenicity in adults of pertussis toxoid inactivated with tetranitromethane. In: International Workshop on *Bordetella pertussis*, Rocky Mountain Laboratories, Hamilton, Montana.
64. **Edwards, K.M., Bradley, R.B., Decker, M.D., Palmer, P.S., Van Savage, J., Taylor, J.C., Dupont, W.D., Hager, C.C., and Wright, P.F. (1989).** Evaluation of a new highly purified pertussis vaccine in infants and children. *J. Infect. Dis.* 160: 832-837.
65. **Rutter, D.A., Ashworth, L.A.E., Day, A., Funnell, S., Lovell, F., and Robinson, A. (1988).** Trial of new acellular pertussis vaccine in healthy adult volunteers. *Vaccine* 6: 29-32.
66. **Blumberg, D.A., Mink, C.A.M., Cherry, J.D., Johnson, C., Garber, R., Plotkin, S.A., Watson, B., Ballanco, G.A., Daum R.S., Sullivan B., Townsend, T.R. Brayton, J., Gooch, W.M., Nelson, D.B., Congeni, B.L., Prober, C.G., Hackell, J.G., Dekker, C.L., Christenson, P.D., and the APDT Vaccine Study Group (1991).** Comparison of acellular and whole cell pertussis-component diphtheria-tetanus-pertussis vaccines in infants. *J. Pediatr.* 119: 194-204.
67. **Englund, J.A., Glezen, W.P. and Barreto, L. (1992a).** Controlled study of a new five-component acellular pertussis vaccine in adults in young children. *J. Inf. Dis.* 166: 1436-1441.
68. **Zealey, G., Loosmore, S., Yacoob, R., Klein, M.,** Vaccine Research, Vol. 1, págs. 413-427.
69. **Baker JD, Halperin SA, Edwards K, Miller B, Decker M, Stephens D.** Antibody response to *Bordetella pertussis* antigens after immunization with American and Canadian whole cell vaccines *J. pediatr.* 1992, 121:523-527.
70. **Halperin SA, Eastwood BJ, Langley JM.** Immune responses to pertussis vaccines concurrently administered with viral vaccines. *Ann NY Acad Sci.* 1995, 754: 89-96.
71. **Halperin SA, Langley JM, Eastwood BJ.** Effect of inactivated poliovirus vaccine on the antibody response to *Bordetella pertussis* antigens when combined with diphtheria-pertussis-tetanus vaccine. *Clin. Infect. Dis.* 1996; impreso.
72. **Ferreccio C., Clemens J, Avendano A. et al.** The clinical and immunogenic response of Chilean infants to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide tetanus protein conjugate vaccine coadministered in the same syringe with diphtheria-tetanus toxoid-pertussis vaccine at two, four and six months of age. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1991; 10:761-771.
73. **Clemens J, Ferreccio C., Levine M. et al.** Impact of *Haemophilus influenzae* typ b polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine on responses to concurrently administered diphtheriatetanus pertussis vaccine. *JAMA* 1992; 267:673-8.

ES 2 271 969 T3

74. **Scheifele D, Barreto L, Meekison W. et al.** Can *Haemophilus influenzae* vaccine be combined with diphtheria and tetanus toxoids. *Can Med Assoc. J.* 1993; 149: 1105-16.

75. **Gold R., Scheifele D., Barreto L. et al.** Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* vaccine (tetanus toxoid conjugate) administered concurrently or combined with diphtheria and tetanus toxoids, pertussis vaccine and inactivated poliomyelitis vaccine to healthy infants at two, four and six months of age. *Pediatr. Infect. Dis J.* 1994; 13: 348-55.

76. **Shinefield H, Black S, Ray P, Lewis E, Fireman B., Hohenboken, hackell JG.** Safety of combined acellular pertussis vaccine in infants [abstract no G72]. In: program and Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobiols and Chemotherapy. Washington, DC; *American Society of Microbiology* 1995: 171.

77. **Greenberg DP, Wong VK, Partridge S, Howe BJ, Fing J, Ward JL.** Evaluation of a new combination vaccine that incorporates diphtheria-tetanus-acellular pertussis, hepatitis b, and *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines [Abstract no G70] In program and Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobiols and Chemotherapy. Washington, DC; *American Society of Microbiology* 1995: 170.

78. **Wassilak SGF, Orenstein WA,** Tetanus, In Plotkin SA, Mortimer EA, Jr., eds, Vaccines, WBSaunders Company, Philadelphia, 1988; 45-73.

79. **Gustaffson et al,** New England J. Medicine, 1996, vol. 334. Pp 349-355.

80. **Mortimer EA Jr,** Diphtheria Toxoid, In Plotkin SA, Mortimer EA, Jr., eds, Vaccines, WB Saunders Company, Philadelphia, 1988; 31-44.

81. **Varughese P:** *Haemophilus Influenzae* infection in Canada, 1969-1985. *Can Dis Wkly Rep* 1986; 12:37-43.

82. **Schelfele D, Gold R, Law B, et al:** Decline in *Haemophilus Influenzae* type b invasive infections at five Canadian pediatric centres. *Can Commun Dis Rep* 1993; 19:88-91.

83. **Scheifele D., Barreto L., Meekison W. et al.:** Can *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccine be combined with diphtheria toxoid-pertussis vaccine-tetanus toxoid? *Can Med Assoc J* 1993, 149:1105-1112.

84. **Gold R, Scheifele D, Barreto L et al.:** Safety and Immunogenicity of *Haemophilus Influenzae* type b vaccine (tetanus toxoid conjugate) administered concurrently or combined with diphtheria and tetanus toxoids, pertussis vaccine and inactivated poliomyelitis vaccines to healthy infants at two, four and six months of age. *Pediatric Infectious Diseases Journal* 1994; 13:348-55.

85. **Scheifele D, Gold R et al.** Canada Communicable Disease Report 22-3, F1-F3 Feb 1, 1996.

ES 2 271 969 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Composición inmunogénica multivalente para proporcionar protección en un huésped frente a una enfermedad causada por la infección por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* y poliovirus, comprendiendo la composición:

- (a) toxoide pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina y aglutinógenos en forma purificada,
- 10 (b) toxoide tetánico,
- (c) toxoide diftérico, y
- (d) poliovirus inactivado,

15 que se formula en forma de vacuna para la administración *in vivo* a un huésped y en la que, por cada dosis humana, dicho toxoide pertussis se encuentra presente en una cantidad de 5 a 30 μg de nitrógeno, dicha hemaglutinina filamentosa se encuentra presente en una cantidad de 5 a 30 μg de nitrógeno, dicha pertactina se encuentra presente en una cantidad de 3 a 15 μg de nitrógeno, y dichos aglutinógenos se encuentran presentes en una cantidad de 1 a 10 μg de nitrógeno.

20 2. Composición según la reivindicación 1, que incluye un adyuvante.

3. Composición según la reivindicación 2, en la que el adyuvante es hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

25 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y que contiene 20 μg de nitrógeno de toxoide pertussis, 20 μg de nitrógeno de hemaglutinina filamentosa, 5 μg de nitrógeno de pertactina y 3 μg de nitrógeno de aglutinógenos, en una sola dosis humana.

30 5. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho toxoide diftérico se encuentra presente en una cantidad de 10 a 20 Lfs y dicho toxoide tetánico se encuentra presente en una cantidad de 1 a 10 Lfs.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho toxoide diftérico se encuentra presente en una cantidad de 15 Lfs y el toxoide tetánico se encuentra presente en una cantidad de 5 Lfs.

35 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho poliovirus inactivado comprende una mezcla de poliovirus inactivados de tipos 1, 2 y 3.

40 8. Composición según la reivindicación 7, en la que dicha mezcla de poliovirus inactivados de tipos 1, 2 y 3 se encuentra presente en las proporciones siguientes:

20 a 50 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 1

5 a 10 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 2

45 20 a 50 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 3, en una sola dosis humana.

9. Composición según la reivindicación 8, en la que dicha mezcla de poliovirus inactivados de tipos 1, 2 y 3 se utiliza en las proporciones siguientes:

50 40 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 1

8 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 2

55 32 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 3, en una sola dosis humana.

60 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que proporciona además, durante la utilización, protección frente a enfermedades causadas por la infección por *Haemophilus influenzae*, incluyendo dicha composición un conjugado de una molécula portadora seleccionada de entre los toxoides tetánicos y diftérico, y un polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b.

11. Composición según la reivindicación 10, en la que dicho conjugado comprende un conjugado de los toxoides tetánico o diftérico y la polirribosa ribitol fosfato (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b.

65 12. Composición según la reivindicación 10 ó 11, en la que dicho conjugado se proporciona en forma liofilizada y se reconstituye para la administración en dicha composición inmunogénica por los componentes de la composición.

ES 2 271 969 T3

13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que dicha composición inmunogénica contiene el conjugado en una cantidad de 5 a 15 μg de PRP conjugado con 15 a 35 μg de toxoide tetánico, en una sola dosis humana.

5 14. Composición según la reivindicación 13, en la que dicha composición inmunogénica contiene el conjugado en una cantidad de 10 μg de PRP conjugado a 20 μg de toxoide tetánico, en una sola dosis humana.

15. Composición de vacuna multivalente según la reivindicación 1, y que comprende, por cada dosis de 0,5 ml, lo siguiente:

10

20 μg de toxoide pertussis

20 μg de hemaglutinina filamentosa

15

5 μg de fimbrias 2 y 3

3 μg de proteína membranal pertactina

20

15 Lf de toxoide diftérico

5 Lf de toxoide tetánico

40 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 1

25

8 unidades de antígeno D de poliovirus de tipo 2

1,5 μg de fosfato de aluminio

16. Composición según la reivindicación 15 y que incluye, por cada dosis de 0,5 ml, lo siguiente:

30

10 μg de polisacárido capsular polirribosa ribitol fosfato (PRP) purificado de *Haemophilus influenzae* tipo b covalentemente unido a 20 μg de toxoide tetánico.

17. Composición según la reivindicación 15 ó 16 y que incluye, por cada dosis de 0,5 ml, lo siguiente:

35

2-fenoxietanol al 0,6%.

18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su utilización como un medicamento.

40

19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para la utilización en la preparación de un medicamento para la inmunización de un huésped frente a una enfermedad.

45

50

55

60

65

Figura 1

