



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 495**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02767756 .6**
96 Fecha de presentación : **26.07.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1409013**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54 Título: **Vacunas que comprenden adyuvantes de aluminio e histidina.**

30 Prioridad: **26.07.2001 GB 0118249**
20.06.2002 PCT/IB02/03191

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.03.2010

73 Titular/es:
Novartis Vaccines and Diagnostics S.R.L.
Via Fiorentina 1
53100 Siena, SI, IT

72 Inventor/es: **Contorni, Mario y**
Maffei, Massimo

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas que comprenden adyuvantes de aluminios e histidina.

5 **Campo técnico**

La presente invención corresponde al campo de la formulación de vacunas.

Antecedentes de la técnica

10

Además de contener sustancias antigénicas, las vacunas también contienen sustancias tales como diluyentes, excipientes, conservantes, estabilizantes y tampones. Normalmente, las vacunas también contienen adyuvantes, es decir, una sustancia que mejora la respuesta inmune generada en respuesta al antígeno de la vacuna.

15

Los adyuvantes usados tradicionalmente en las vacunas humanas han sido sales de aluminio tales como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Muchos otros adyuvantes experimentales son conocidos y estos se revisan, por ejemplo, en la referencia 1. La adsorción a las sales de aluminio continúa siendo, sin embargo, la formulación de adyuvante de vacunas más común.

20

Si bien su uso está difundido, las sales de aluminio no siempre son compatibles con antígenos particulares. Se ha sugerido, por ejemplo, que el hidróxido de aluminio puede no ser adecuado para el uso en vacunas multivalentes que incluyen el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B [2] o para usar con el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* [3]. También se ha sugerido que diferentes antígenos dentro de la misma formulación de vacuna se deben adsorber a diferentes sales de aluminio [4] por razones de compatibilidad.

25

Además de la compatibilidad con el antígeno, es necesario considerar la estabilidad de la vacuna cuando se usan sales de aluminio. Por ejemplo, se ha demostrado que su capacidad para la adsorción de proteínas disminuye con el tiempo a temperatura ambiente [5] y en respuesta al autoclavado [6]. Las sales de aluminio también pueden causar dificultades en el liofilizado [7]. Por otra parte, se ha hallado que el hidróxido de aluminio puede hidrolizar antígenos de tipo sacárido [8], incluso a temperaturas bajas y cuando el antígeno se conjuga a una proteína portadora, llevando en consecuencia a una reducción de la eficacia.

30

En general, estos problemas sólo surgen cuando la atención se pone en formular un antígeno para uso clínico y pueden no ser apreciados durante la investigación inicial y el desarrollo del propio antígeno.

35

Un objeto de la invención es proporcionar mejoras en la estabilidad de las vacunas que incluyen sales de aluminio y, en particular, mejoras en la estabilidad del pH (tamponado) y adsorción del adyuvante a diversas temperaturas y/o mejoras de la estabilidad del antígeno (por ejemplo reducción de la hidrólisis).

40 **Descripción de la invención**

La invención se define en las reivindicaciones y se basa en el descubrimiento sorprendente de que el aminoácido histidina aumenta la estabilidad de las vacunas que incluyen adyuvantes de sales de aluminio. Esto se ha hallado tanto para los antígenos de tipo sacárido adsorbidos como para los antígenos proteicos adsorbidos.

45

La histidina se ha incluido previamente en las vacunas con adyuvantes de aluminio. La referencia 4 describe el uso de L-histidina en una vacuna de combinación de Hib/DTPa que tiene antígenos adsorbidos a un adyuvante de fosfato de aluminio. La referencia 95 describe vacunas en las que los antígenos de la vacuna del papilomavirus humano se adsorben a una sal de aluminio y luego se mezclan con un tampón de formulación que comprende una sal, un tampón de histidina y un tensioactivo no iónico.

50

El antígeno

El antígeno es preferentemente un antígeno proteico o un antígeno de tipo sacárido (opcionalmente conjugado). Los antígenos preferidos son de bacterias, siendo particularmente preferido el género bacteriano *Neisseria* (por ejemplo, *N. meningitidis*).

55

Los antígenos bacterianos específicos para utilizar con la invención incluyen:

60

- un antígeno proteico del serogrupo B de *N. meningitidis*, tal como los de las referencias 9 a 15, prefiriéndose particularmente la proteína "287" (véase más abajo) y derivados (por ejemplo "ΔG287"),

- una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) del serogrupo B de *N. meningitidis*, tal como las descritas en las referencias 16, 17, 18, 19, etc.

65

- un antígeno de tipo sacárido del serogrupo A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*, tal como el oligosacárido descrito en la referencia 20 del serogrupo C [véase también la referencia 21].

ES 2 334 495 T3

Otros antígenos que se pueden usar incluyen:

- un antígeno de tipo sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo 22, 23, 24].

- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, referencias 25 & 26].

- un antígeno de difteria, tal como un toxoide de difteria [por ejemplo, capítulo 3 de la referencia 27], por ejemplo la mutante CRM197 [por ejemplo 28].

- un antígeno del tétanos, tal como un toxoide del tétanos [por ejemplo, capítulo 4 de la referencia 27].

- un antígeno proteico del *Helicobacter pylori* tal como CagA [por ejemplo 29], VacA [por ejemplo 29], NAP [por ejemplo 30], HopX [por ejemplo 31], HopY [por ejemplo 31] y/o ureasa.

- un antígeno de tipo sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo 21], preferentemente un oligosacárido.

- un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo 9, 10, 11].

- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38].

- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo 39].

- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo 40].

- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo 41].

- un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [por ejemplo 42, 43].

- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo As) [por ejemplo 43, 44, 45].

- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo 46].

- un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo 47, 48, 49].

- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como un virus inactivado [por ejemplo 50, 51].

- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o del núcleo [por ejemplo 51,52].

- un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo 53].

- antígeno(s) de polio [por ejemplo 54, 55] tales como IPV.

- antígeno(s) de la rabia [por ejemplo 56], tal como un virus inactivado liofilizado [por ejemplo RabAvert™].

- antígenos de sarampión, paperas y/o rubéola [por ejemplo capítulos 9, 10 & 11 de la referencia 27].

- antígeno(s) de la influenza [por ejemplo capítulo 19 de la referencia 27], tales como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa.

- un antígeno de un virus de la familia flaviviridae (género flavivirus), tal como el virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, cuatro serotipos de los virus del dengue, virus de encefalitis transmitido por garrapatas, virus del Nilo Occidental.

- un antígeno pestivirus, tal como del virus de la fiebre porcina clásica, virus de la diarrea viral bovina y/o virus de la enfermedad de frontera.

- un antígeno del parvovirus, por ejemplo del parvovirus B19.

La composición puede comprender uno o más de estos antígenos bacterianos y virales adicionales. La composición puede comprender antígenos no virales.

Otros antígenos que se pueden usar incluyen:

- una proteína priónica (por ejemplo la proteína priónica de CJD)

- una proteína amiloide, tal como un péptido beta [58]

ES 2 334 495 T3

- un antígeno del cáncer, tales como los enumerados en la Tabla 1 de la referencia 59 o en las tablas 3 & 4 de la referencia 60.

5 Cuando se usa un antígeno de tipo sacárido o carbohidrato, preferentemente se conjuga con una proteína portadora a fin de mejorar la inmunogenicidad [por ejemplo, referencias 61 a 70]. Las proteínas portadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoides de difteria o tétanos. El toxoide de difteria CRM197 se prefiere particularmente. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [por ejemplo, ref. 71], péptidos sintéticos [por ejemplo, 72, 73], proteínas de shock térmico [por ejemplo, 74], proteínas de pertussis [por ejemplo, 75, 76], proteína D de *H. influenzae* [por ejemplo, 77], toxina A o B de *C. difficile* [por ejemplo, 78], etc. Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de ambos serogrupos A y C, se prefiere que la relación (p/p) del sacárido MenA: sacárido MenC sea mayor que 1 (por ejemplo 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor). Los sacáridos de diferentes serogrupos de *N. meningitidis* se pueden conjugar con proteínas portadoras iguales o diferentes.

15 Se puede usar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier ligador adecuado, cuando sea necesario.

Los antígenos proteicos tóxicos se pueden detoxificar cuando sea necesario (por ejemplo detoxificación de toxina de pertussis por medios químicos y/o genéticos [26]).

20 Las partículas tipo virus (VLP) del virus del papiloma humano (HPV) no son antígenos preferidos (compárense los documentos WO00/45841, WO00/57906, WO01/28585).

25 Cuando se incluye un antígeno de la difteria en la composición se prefiere incluir también el antígeno del tétanos y antígenos de pertussis. De modo similar, cuando se incluye un antígeno del tétanos se prefiere incluir también antígenos de difteria y pertussis. De modo similar, cuando se incluye un antígeno de pertussis se prefiere incluir también antígenos de difteria y tétanos. Se pueden usar el antígeno de pertussis de célula completa.

Cuando está presente HBsAg, preferentemente se adsorbe al hidroxifosfato de aluminio o no se adsorbe a ninguna sal. Preferentemente se evita la adsorción del HBsAg a un hidróxido de aluminio.

30 Cuando está presente un antígeno de tipo sacárido de *H. influenzae*, preferentemente se adsorbe a hidroxifosfato de aluminio o no se adsorbe a ninguna sal. Preferentemente se evita la adsorción de los sacáridos de Hib a un hidróxido de aluminio.

35 Los antígenos de la composición normalmente estarán presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para inducir una respuesta inmune contra ese antígeno.

40 Como alternativa al uso de antígenos proteicos en la composición de la invención, se pueden usar ácidos nucleicos que codifican el antígeno [por ejemplo, referencias 79 a 87]. Los componentes proteicos de las composiciones de la invención de este modo se pueden reemplazar por un ácido nucleico (preferentemente ADN, por ejemplo en la forma de un plásmido) que codifica la proteína.

La sal de aluminio

45 La sal de aluminio es preferentemente un hidróxido de aluminio (por ejemplo oxihidróxido de aluminio) o un fosfato de aluminio (por ejemplo hidroxifosfato u ortofosfato de aluminio), pero se puede usar cualquier otra sal adecuada (por ejemplo, sulfato, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 & 9 de la referencia 1]). La sal puede adoptar cualquier forma adecuada (por ejemplo gel, cristalina, amorfa, etc.). Las sales preferidas son hidroxifosfatos (amorfos) y oxihidróxido (cristalino) (bohemita).

50 Los hidroxifosfatos se obtienen por precipitación y las condiciones de reacción y las concentraciones de reactivos durante la reacción de precipitación influyen en el grado de sustitución del fosfato por hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos generalmente tienen una relación molar PO_4/Al entre 0,3 y 0,99, y las sales preferidas tienen una relación entre 0,8 y 0,95 (por ejemplo 0,88±0,05). Los hidroxifosfatos $[\text{Al}(\text{OH})_x(\text{PO}_4)_y]$, en los que la suma de la valencia de cada anión multiplicado por su fracción molar es -3] se pueden distinguir del AlPO_4 por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda del espectro de IR a 3146 cm^{-1} (por ejemplo, cuando se calienta a 200°C) indica la presencia de hidroxilos estructurales.

60 El oxihidróxido de aluminio $[\text{AlO}(\text{OH})]$ se puede distinguir del $\text{Al}(\text{OH})_3$ por espectroscopia IR, en particular por la presencia de una banda de absorción a 1070 cm^{-1} y un pico fuerte a $3090\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$.

También se pueden usar mezclas de diferentes sales de aluminio. Se prefiere, sin embargo, usar esencialmente una sola sal; por ejemplo, cuando se usan dos sales, la relación de una a otra es al menos 5:1 en peso, por ejemplo al menos 10:1, 100:1, 1000:1, etc.

65 La sal generalmente estará presente de modo que la concentración de Al^{3+} sea al menos 1 µg/ml (por ejemplo, al menos 10 µg/ml, al menos 100 µg/ml, etc.).

ES 2 334 495 T3

El uso de histidina en combinación con un fosfato de aluminio (particularmente un hidroxifosfato) es particularmente ventajoso para los antígenos ácidos.

La histidina

5

La histidina es un aminoácido estándar y está fácilmente disponible para usar con la invención. Debido a que es intrínsecamente biocompatible, es segura y, en consecuencia, ventajosa como componente de las vacunas.

10

La concentración de histidina en la composición será normalmente de al menos 1 μ M y a lo sumo 1M. La concentración es preferentemente al menos 1 mM (por ejemplo, al menos 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, etc.) y es preferentemente a lo sumo 250 mM (por ejemplo, a lo sumo 200 mM, 150 mM, 100 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM, etc.). Más preferentemente, la concentración de histidina en la composición está entre 2 mM y 10 mM (por ejemplo, entre 5 mM y 8 mM) y, con máxima preferencia, es aproximadamente 5 mM.

15

La histidina es preferentemente L-histidina.

La histidina preferentemente actúa como tampón. Los tampones de histidina son bien conocidos por los expertos. Por consiguiente, la histidina se puede ionizar dentro de la composición de la invención.

20

La composición preferentemente tiene mejor estabilidad de pH y/o reducción de la hidrólisis del antígeno cuando se compara con una composición equivalente en la que el sistema tampón de histidina se reemplaza con un sistema tampón de fosfato de sodio o no se incluye un sistema tampón. La reducción de la hidrólisis puede ser una consecuencia del aumento de estabilidad del pH.

25

La histidina se puede añadir a la composición en la forma del propio aminoácido o en forma de sal. Una sal de histidina típica es el monohidrato del monohidrócloruro.

30

Se apreciará que las referencias a la histidina en las composiciones de la invención se refieren a histidina “libre” más que a cualquier residuo de histidina que puede ser parte de un polipéptido (por ejemplo el antígeno) dentro de la composición.

Otras características de la composición

35

La composición está preferentemente en forma líquida, pero puede estar liofilizada (compárese con WO01/41800).

40

La composición también puede comprender una sal de sodio, por ejemplo fosfato de sodio o cloruro de sodio. La concentración de la sal de sodio es preferentemente al menos 1 mM (por ejemplo, al menos 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM etc.) y es preferentemente a lo sumo 10 mM (por ejemplo, a lo sumo 10 mM, 9 mM, 8 mM, 7 mM, etc.). Más preferentemente, la concentración de sal de sodio en la composición está entre 1 mM y 5 mM (por ejemplo entre 2 mM y 3 mM) y, con máxima preferencia, es aproximadamente 2,5 mM.

45

Una ventaja particular de la invención es que permite un buen control del pH y la adsorción en las vacunas que contienen altas concentraciones de iones fosfato libre, iones que pueden ser inevitables en la vacuna, por ejemplo, debido al intercambio con los fosfatos del adyuvante, o debido al tampón de fosfato residual. Cuando están presentes iones fosfato residuales entre 3 y 5 mM, por ejemplo, el pH es difícil de controlar entre 6,0 y 7,0, y algunos antígenos tienden a desorberse de los adyuvantes, pero la adición de histidina 5 a 10 mM permite controlar el pH y la adsorción, incluso durante la conservación a temperaturas elevadas.

50

La relación molar de la histidina a fosfato libre es preferentemente al menos 1,25:1 por ejemplo 1,5:1, 1,75: 1,2:1, 2,25:1, 2,5:1, 3:1, 4:1, etc.

El pH de la composición está preferentemente entre 6 y 7 (por ejemplo entre 6,3 y 7,0). El pH se puede mantener por el uso de un tampón. Esto normalmente se logrará inherentemente por la histidina en la composición.

55

La composición no contendrá, en general: suero (por ejemplo, suero de ternero fetal, etc.) u otro componente semejante usado en el cultivo celular; ADN de célula huésped a un nivel mayor de 100 μ g/dosis para los antígenos purificados del cultivo celular; células vivas.

60

La composición generalmente será estéril y/o libre de pirógenos.

La composición puede comprender un detergente (por ejemplo un Tween, tal como Tween 80) a fin de minimizar la adsorción de los antígenos a los recipientes.

65

La composición preferentemente no comprende un conservante. Cuando está presente un conservante, se pueden usar conservantes mercuriales (por ejemplo timerosal) (compárese con WO98/34594). Los conservantes que pueden estar presentes o ausentes son 2-fenoxi-etanol, metil parabenos, propil parabenos y alcohol bencílico (o sus mezclas).

Composiciones inmunogénicas y medicamentos

La composición de la invención es normalmente una composición de vacuna.

5 La invención también proporciona una composición de la invención para utilizar como medicamento. El medicamento preferentemente puede originar una respuesta inmune en un mamífero contra el antígeno (es decir, es una composición inmunogénica) y es más preferentemente una vacuna.

10 La invención también proporciona el uso de una composición de la invención en la fabricación de un medicamento para generar una respuesta inmune en un mamífero contra el antígeno. El medicamento es preferentemente una vacuna.

La respuesta inmune es preferentemente protectora. El medicamento puede generar una respuesta de refuerzo.

15 El mamífero es preferentemente un ser humano y, más preferentemente, un niño.

Estos usos son preferentemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por una *Neisseria* (por ejemplo, meningitis, septicemia, gonorrea, etc.), por *H. influenzae* (por ejemplo, otitis media, bronquitis, neumonía, celulitis, pericarditis, meningitis, etc.) o por neumococos (por ejemplo, meningitis, sepsis, neumonía, etc.). En consecuencia, se prefiere la prevención y/o el tratamiento de la meningitis bacteriana.

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

Componentes adicionales de la composición

25 La composición de la invención normalmente, además de los componentes mencionados anteriormente, comprenderá uno o más "vehículos farmacéuticamente aceptables", que incluye cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son normalmente macromoléculas grandes, de metabolismo lento, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, 30 ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, trehalosa (WO00/56365) y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Dichos vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias reguladoras del pH y similares. Una descripción completa de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's 35 Pharmaceutical Sciences [por ejemplo, ref. 88].

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de antígeno, así como cualquier otro de los componentes mencionados anteriormente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente efectiva", se entiende que la administración de esta cantidad a un individuo, ya sea en dosis única 40 o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía de acuerdo con la salud y condición física del individuo tratado, la edad, el grupo taxonómico del individuo tratado (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseada, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico tratante de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se incluya en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar 45 mediante ensayos de rutina. El tratamiento de dosificación puede ser un esquema de dosis única o un esquema de múltiples dosis (por ejemplo, que incluye dosis de refuerzo). La vacuna se puede administrar en conjunto con otros agente inmunorreguladores.

50 La vacuna se puede administrar en conjunto con otros agentes inmunorreguladores.

La vacuna puede incluir un adyuvante además de la sal de aluminio. Los adyuvantes preferidos que aumentan la efectividad de la composición incluyen, pero sin limitación: (1) formulaciones de una emulsión aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (ver más abajo) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo: (a) MF59TM (WO90/14837; Capítulo 10 de la referencia 1), que 55 contiene 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85 (que contiene opcionalmente MTP-PE) formulado en partículas submicrónicas usando un microfluidificador, (b) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 bloqueado con plurónico, y thrMDP microfluidificado en una emulsión submicrónica o agitado en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula y (c) sistema adyuvante RibiTM (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de la pared 60 celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DetoxTM); (2) se pueden usar adyuvantes de saponina, tales como QS21 o StimulonTM (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o partículas generadas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes), pudiendo estos ISCOMS estar desprovistos de detergente adicional, por ejemplo WO00/07621; (3) adyuvante de Freund completo (CFA) y adyuvante de Freund incompleto (IFA); (4) 65 citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO99/44636), etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (5) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-0-desacilado (3dMPL), por ejemplo GB-2220221, EP-A-0689454; (6) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones aceite en agua, por ejemplo EP-

A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (7) oligonucleótidos que comprenden motivos de CpG [Krieg Vaccine 2000, 19, 618-622; Krieg Curr Opin Mol Ther 2001 3: 15-24; Roman *et al.*, Nat. Med., 1997, 3, 849-854; Weiner *et al.*, PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis *et al.*, J. Immunol., 1998, 160, 870-876; Chu *et al.*, J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631; Lipford *et al.*, Eur. J. Immunol., 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu *et al.*, Vaccine, 1988, 16, 1216-1224; Krieg *et al.*, Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman *et al.*, PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballas *et al.*, J. Immunol., 1996, 157, 1840-1845; Cowdery *et al.*, J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575; Halpern *et al.*, Cell. Immunol., 1996, 167, 72-78; Yamamoto *et al.*, Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey *et al.*, J. Immunol., 1996, 157, 2116-2122; Messina *et al.*, J. Immunol., 1991, 147, 1759-1764; Yi *et al.*, J. Immunol., 1996, 157, 4918-4925; Yi *et al.*, J. Immunol., 1996, 157, 5394-5402; Yi *et al.*, J. Immunol., 1998, 160, 4755-4761; y Yi *et al.*, J. Immunol., 1998, 160, 5898-5906; Solicitudes de patentes internacionales WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, 45 WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581], es decir, que contienen al menos un dinucleótido CG, utilizándose 5-metilcitosina opcionalmente en lugar de citosina; (8) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno, por ejemplo WO99/52549; (9) un tensioactivo de éster de polioxietileno sorbitano en combinación con un octoxinol (por ejemplo, WO01/21207) o un éter polioxietilentalquílico o éster tensioactivo en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (por ejemplo, WO01/21152); (10) un oligonucleótido inmunoestimulante (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) y una saponina, por ejemplo WO00/62800; (11) un inmunostimulante y una partícula de sal metálica, por ejemplo WO00/23105; (12) una saponina y una emulsión aceite en agua, por ejemplo WO99/11241; (13) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide), por ejemplo WO98/57659; (14) quitosano; (15) toxina del cólera o toxina lábil al calor de *E. coli*, o sus mutantes detoxificadas [89]; (16) micropartículas de poli (α -hidroxil)ácidos, tales como PLG; (17) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para aumentar la eficacia de la composición.

Los péptidos de muramilo incluyen N-acetil-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramilo-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramilo-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicerol-3-hidroxi)fosforiloxi-etilamina MTP-PE), etc.

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

Normalmente, las composiciones inmunogénicas se preparan en forma inyectable, sea como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas para un mejor efecto adyuvante. La administración directa de las composiciones en general será parenteral (por ejemplo, por inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular o administrada en el espacio intersticial de un tejido). Las composiciones también se pueden administrar a una lesión. Otros modos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas (por ejemplo, ver WO98/20734), agujas, e hiposprays. El tratamiento de dosificación puede ser un esquema de dosis única o esquema de múltiples dosis (por ejemplo, que incluyen dosis de refuerzos).

La etapa de mezclar antígeno, sal de aluminio e histidina

Para obtener composiciones de la invención, se deben combinar antígenos, sal de aluminio e histidina. Se prefiere que cuando el antígeno y la sal de aluminio se mezclen, debe estar presente la histidina.

La histidina de este modo está presente durante la adsorción de la sal de aluminio. Esto se compara con la adición de histidina a una combinación de antígeno/sal de aluminio que ya existe, es decir, la histidina no se adiciona simplemente como un tampón después que han interactuado el antígeno y la sal de aluminio, sino que en cambio está presente durante su interacción.

En el procedimiento de la invención, en consecuencia, el antígeno se mezcla preferentemente con una mezcla de histidina/sal de aluminio. El procedimiento de la invención, en consecuencia, puede comprender las siguientes etapas: (a) preparar una mezcla de la sal de aluminio y la histidina; y (b) mezclar el antígeno con dicha mezcla. La mezcla de (a) es preferentemente acuosa y se puede preparar en condiciones acuosas o puede ser una mezcla seca que se rehidrata antes de usar.

Una vez que se han adsorbido uno o más antígenos a una sal de aluminio en presencia de histidina, la mezcla se puede combinar con otros antígenos, por ejemplo combinarse con composiciones existentes de difteria, tétanos, pertussis, polio o virus de hepatitis B.

Definiciones

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

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

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el análisis por SDS-PAGE de composiciones antigénicas después de la centrifugación. La calle 1 incluye marcadores de PM (220, 97, 66, 46, 30, 21, 14 kDa). El antígeno OMV (2 µg) se usó en la calle 2; el antígeno ΔG287 se usó en las calles 3 (10 µg) y 4 (0,5 µg). El antígeno usado en las calles 5 y 6 fue una combinación de OMV (50 µg/ml) y ΔG287 (100 µg/ml) con 1 mg/ml de oxihidróxido de aluminio; la composición de la calle 5 incluyó fosfato de sodio (PBS) 10 mM, mientras que la composición de la calle 6 incluyó histidina 5 mM en solución salina.

La Figura 2 también muestra el análisis por SDS-PAGE de composiciones antigénicas después de la centrifugación. La calle 1 incluye los mismos marcadores de PM que en la Figura 1. El antígeno OMV (2,5 µg) se usó en la calle 2; el antígeno ΔG287 se usó en las calles 3 (2 µg) y 4 (0,5 µg). El antígeno usado en las calles 5, 6 y 7 fue una combinación de OMV (50 µg/ml) y ΔG287 (100 µg/ml) con 1 mg/ml de oxihidróxido de aluminio en solución salina (pH 6,5); la composición de la calle 5 incluyó fosfato de sodio 2,5 mM, la composición de la calle 6 incluyó histidina 5 mM y la composición de la calle 7 incluyó histidina 10 mM.

La figura 3 también muestra el análisis por SDS-PAGE de composiciones antigénicas después de la centrifugación. La calle 1 incluye los mismos marcadores de PM que la figura 1. El antígeno OMV (2 µg) se usó en la calle 2; el antígeno ΔG287 se usó en las calles 3 (2 µg) y 4 (0,5 µg). El antígeno usado en las calles 5 y 6 fue una combinación de OMV (50 µg/ml) y ΔG287 (100 µg/ml) con 3,3 mg/ml de oxihidróxido de aluminio en solución salina (pH 6,5); la composición de la calle 5 incluyó fosfato de sodio (PBS) 2,5 mM, mientras que la composición de la calle 6 incluyó histidina 5 mM en solución salina.

La Figura 4 muestra la estabilidad del pH de las formulaciones de la vacuna a 4°C. Los símbolos llenos representan vacunas tamponadas con histidina 5 mM; los símbolos abiertos representan vacunas tamponadas con fosfato de sodio 2,5 mM. El pH inicial fue 6,0 (rombo), 6,5 (cuadrado) o 7,0 (triángulo).

La Figura 5 muestra lo mismo a 37°C.

La Figura 6 muestra un gel de SDS-PAGE para varios antígenos. La calle 1 contiene marcadores de PM. Las calles 2 a 6 contienen los marcadores: (2) ΔG287-953; (3) 961c; (4) 936-741; (5) OMV de Nueva Zelanda; y (6) OMV noruegos. Las calles 7 a 10 muestran sobrenadantes de las formulaciones de histidina centrifugados de la invención después de 1 mes de almacenamiento a 2-8°C: (7) ΔG287-953; (8) 961c + 936-741 + ΔG287-953; (9) 961c + 936-741 + ΔG287-953 + OMVNZ; (10) 961c + 936-741 + ΔG287-953 + OMV_{Norway}.

La Figura 7 muestra lo mismo que la Figura 6, pero las calles 7-10 son después del almacenamiento a 36-38°C.

La Figura 8 muestra un gel de SDS-PAGE para varios antígenos. La calle 1 contiene marcadores de PM. Las calles 2 a 5 contienen los marcadores: (2) 961c; (3) 936-741; (4) OMV de Nueva Zelanda; y (5) OMV noruegos. Las calles 6 a 9 muestran sobrenadantes de las formulaciones de histidina centrifugados de la invención después de 1 mes de almacenamiento a 2-8°C: (6) 961c; (7) 936-741; (8) OMVNZ; (9) OMV noruego.

La Figura 9 muestra lo mismo que la Figura 8, pero las calles 6-9 son después del almacenamiento a 36-38°C.

La Figura 10 muestra un gel de SDS-PAGE para OMV de Nueva Zelanda. La calle 1 contiene marcadores de PM. Las calles 2, 3, 6 & 7 contienen los marcadores OMV almacenados a -8°C (calles 2 & 3) o 36-38°C (calles 6 & 7), presentes en 2 µg (las calles 2 & 6) o 1 µg (calles 3 & 7). Las calles 4, 5, 8 & 9 muestran OMV en formulaciones de histidina de la invención después de 0 días de almacenamiento a 2-8°C (calles 4 & 5) o 36-38°C (calles 8 & 9). Las calles 4 & 8 muestran el sobrenadante de OMV centrifugados, mientras que las calles 5 & 9 muestran pelets.

Modos de llevar a la práctica la invención

Ejemplo 1

Estabilidad del pH y adsorción de antígeno meningocócico B “287”

La referencia 11 desvela un antígeno proteico denominado “287” del serogrupo B de *N. meningitidis*. La referencia 90 desvela una forma de este antígeno (“ΔG287”) que está truncado para eliminar los aminoácidos N-terminales y que incluye su región de hexaglicina. 287 y ΔG287 son capaces de inducir una respuesta inmune protectora en ratones. Las referencias 16 a 19 desvelan antígenos de OMV del serogrupo B de *N. meningitidis*. Estos OMV también pueden inducir una respuesta inmune protectora en ratones.

Estos dos antígenos se formularon por adsorción a un adyuvante de oxihidróxido de aluminio. Se examinaron dos con concentraciones de adyuvante (1 mg/ml y 3,3 mg/ml).

Estudios de inmunización en ratones demostraron que la inmunogenicidad de la vacuna está ligada al nivel de adsorción de los antígenos al adyuvante. Para evaluar los niveles de adsorción, las muestras de las formulaciones se centrifugaron a 1300 rpm durante 10 minutos y se analizó el sobrenadante por SDS-PAGE a fin de detectar la presencia

ES 2 334 495 T3

de antígeno no adsorbido. Los estándares de proteínas relevantes a una concentración apropiada se cargaron en forma adyacente para la comparación cuantitativa.

A fin de mantener un pH fisiológico estable a 4°C y 37°C durante un período de 4 semanas usando tampón de fosfato de sodio, se halló que la composición requiere de fosfato de sodio 10 mM. A este nivel, sin embargo, la adsorción de ΔG287 fue sólo del 50% (Figura 1, calle 5). Se podría mantener 100% de adsorción con fosfato de sodio 2,5 mM (calles 5 de las figuras 2 & 3), pero esta composición no tiene un pH estable a 4°C o 37°C.

En consecuencia, fue necesario hallar un sistema tampón alternativo que debería mantener la estabilidad del pH sin disminuir la adsorción.

La adsorción fue del 95-100% usando histidina 5 mM (calles 6 de las figuras 1, 2 & 3) y también mediante histidina 10 mM (Figura 2, calle 7). En términos de adsorción, en consecuencia, 5 mM o 10 mM de histidina fue equivalente a 2,5 mM de fosfato de sodio en presencia de 1 mg/ml (Figuras 1 & 2) o 3,3 mg/ml (Figura 3) de oxihidróxido de aluminio.

A fin de definir el intervalo de pH en el que las composiciones de vacuna son estables, se eligieron tres valores de pH de partida (pH 6,0, 6,5 y 7,0) y se controló la estabilidad del pH durante cuatro semanas en presencia de fosfato de sodio 2,5 mM o de histidina 5 mM. La estabilidad se controló a 4°C y 37°C.

El antígeno en todas las vacunas fue una combinación de ΔG287 (100 µg/ml) y OMV (50 µg/ml) adyuvada con 3,3 mg/ml de oxihidróxido de aluminio.

La figura 4 muestra la estabilidad del pH a 4°C y la figura 5 muestra la estabilidad del pH a 37°C [NB - debido a la contaminación bacteriana, no fue posible la medición de la vacuna tamponada con histidina a pH 6,0 a las 4 semanas].

A ambas temperaturas el pH tendió a aumentar durante el tiempo con tampón de fosfato de sodio 2,5 mM pero fue estable en presencia del tampón de 5 de histidina mM.

En comparación con un tampón de fosfato de sodio, por lo tanto, el uso de histidina ofrece estabilidad de pH durante el tiempo sin reducir la adsorción.

Ejemplo 2

Adsorción del sacárido antígeno del meningococo C

Los conjugados de sacárido tienden a degradarse por hidrólisis [7,8] cuando están presentes en solución (vacunas "líquidas"). Los conjugados se pueden liofilizar para evitarlo [7], pero esto requiere añadir el adyuvante en el momento de la reconstitución. Sería preferible contar con una vacuna en forma líquida en la que el sacárido no esté sujeto a degradación hidrolítica.

Esto se investigó para un conjugado del oligosacárido del meningococo del serogrupo C en la proteína portadora CRM₁₉₇ [20]. CRM₁₉₇ es ácida y de este modo no se adsorbe completamente a los fosfatos de aluminio cargados negativamente. La histidina, sin embargo, está cargada positivamente y se considera que podría enmascarar la carga negativa. El tampón de histidina, en consecuencia, se analizó con el fin de mejorar la adsorción de MenC-CRM₁₉₇ al hidroxifosfato de aluminio.

Se evaluó la adsorción del antígeno en presencia y ausencia del tampón de histidina midiendo la concentración de proteína en el sobrenadante de la vacuna usando el ensayo de proteína de BCA después de la centrifugación para separar el pelet de adyuvante. Las vacunas se formularon con 20 µg/ml de oligosacárido y 45 µg/ml de proteína CRM₁₉₇. Los resultados fueron los siguientes:

Antígeno	Adyuvante	[Histidina] (mM)	Proteína (µg/ml)
MenC-CRM ₁₉₇	Hidroxifosfato Al ³⁺ =0,6 mg/ml	0	42,4
		5	28,6
		10	21,7

En consecuencia, la adsorción del antígeno aumenta cuando está presente la histidina en la formulación: la adsorción es aproximadamente 6% en ausencia de histidina; la histidina 5 mM incrementa la adsorción a 36%; la histidina 10 mM la incrementa a casi 52%.

ES 2 334 495 T3

En consecuencia, la histidina es un aditivo útil para aumentar la adsorción de los antígenos al hidroxifosfato de aluminio.

5 Ejemplo 3

Adsorción del antígeno meningocócico B NadA

La NadA (adhesina A de Neisseria) del serogrupo B de *N. meningitidis* se describe como proteína “961” en la referencia 11 (SEQ ID 2943 & 2944) y como “NMB1994” en la referencia 13 (ver también números de acceso al GenBank 11352904 & 7227256). Las formas alélicas de NadA se describen en la referencia 91. Las formas preferidas de NadA carecen del dominio de anclaje del extremo C- terminal (“961c”).

Se adsorbió 961c (100 µg/ml) en oxihidróxido de aluminio (3 mg/ml) en presencia de tampón de histidina 10 mM, pH 6,5. Después de 4 semanas de almacenamiento a 2-8°C o a 36-38°C, el antígeno permaneció 100% adsorbido (Figuras 8 & 9, calle 6). El pH de la composición fue 6,44 a tiempo cero y después de 4 semanas de almacenamiento ascendió muy ligeramente a 6,48 (2-8°C) o 6,47 (36-38 °C).

20 Ejemplo 4

Adsorción de antígenos híbridos meningocócicos B

La referencia 92 desvela la expresión híbrida de los antígenos B meningocócicos. Uno de dichos híbridos es “ΔG287_{nz}-953” y el otro es “936-741”. Estos dos híbridos (100 µg/ml) se adsorbieron en oxihidróxido de aluminio (3 mg/ml) en presencia de tampón de histidina 10 mM, pH 6,3. Después de 4 semanas de almacenamiento a 2-8°C o a 36-38°C, “ΔG287_{nz}-953” permaneció 100% adsorbido (Figuras 6 & 7, calle 7), con un ligero aumento de pH de 6,44 a 6,52 (2-8°C) o 6,53 (36-38°C). “936-741” permaneció 100% adsorbido a 36-38°C (Figura 9, calle 7) pero fue ~99% adsorbido a 2-8°C (Figura 8, calle 7), con un ligero aumento de pH de 6,33 a 6,37 (2-8°C) o 6,38 (36-38°C).

30

Ejemplo 5

Adsorción de OMV meningocócicas

35

Como se mencionó anteriormente, las vacunas de OMV del meningococo B son bien conocidas. Se prepararon OMV a partir de la cepa noruega del meningococo B o de una cepa de Nueva Zelanda (394/98). Estas dos preparaciones de OMV (50 µg/ml) se adsorbieron en oxihidróxido de aluminio (3 mg/ml) en presencia de tampón de histidina 10 mM, pH 6,5. Después de 4 semanas de almacenamiento a 2-8°C o a 36-38°C, ambas preparaciones de OMV permanecieron 100% adsorbidas (Figuras 8 & 9, calles 8 & 9). Para las OMV noruegas, el pH ascendió ligeramente de 6,39 a 6,42 durante 4 semanas a ambas temperaturas de almacenamiento. Para la OMV de Nueva Zelanda, el pH ascendió ligeramente de 6,40 a 6,42 (2-8°C) o 6,43 (36-38°C). Las OMV de Nueva Zelanda se formularon alternativamente con histidina 5 mM. Comenzando con agua pura, se añadió oxihidróxido de aluminio, seguido de histidina, con 10 minutos de mezclado. Posteriormente se añadieron las OMV y se mezclaron durante 15 minutos. Posteriormente se añadió NaCl seguido de 10 minutos de mezclado adicional. La composición final fue de 3,3 mg/ml de oxihidróxido de aluminio, 7,5 mM en NaCl, 5 mM en histidina, 100 µg/ml de OMV, pH 6,42.

45

Durante el almacenamiento a 2-8°C o 36-36°C, el pH y la adsorción de OMV variaron de la siguiente manera:

50

	pH		% de adsorción	
	2-8 °C	36-38 °C	2-8 °C	36-38 °C
Tiempo cero	6,42	6,42	100	100
15 días	6,36	6,37	100	100
30 días	6,35	6,34	100	100

55

60

Una comparación de las calles 4 & 5 (2-8°C) o las calles 8 & 9 (36-38°C) de la Figura 10 muestra que las OMV permanecen adsorbidas después de 1 mes de almacenamiento.

65

ES 2 334 495 T3

Ejemplo 6

Adsorción de mezclas de OMV meningocócicas y antígenos proteicos

Se mezclaron 961c, ΔG287_{nz}-953 y 936-741 a razón de 100 μg/ml de cada antígeno y la mezcla se adsorbió en oxihidróxido de aluminio (3 mg/ml) en presencia de tampón de histidina 10 mM, pH 6,3. En dos formulaciones adicionales, las OMV se incluyeron (50 μg/ml) en las cepas de meningococo de Noruega o Nueva Zelanda.

Todos los antígenos de las tres mezclas (Figuras 6 & 7, calles 8-10) mostraron 100% de adsorción después de 4 semanas de almacenamiento a 2-8°C o a 36-38°C, excepto para 936-741, que fue ~96% adsorbido en las tres mezclas a 2-8°C y ~99% adsorbido a 36-38°C. El pH de cada una de las tres mezclas aumentó ligeramente de 6,53 en tiempo cero a 6,62 después de 4 semanas a 2-8°C. A 36-38°C, el pH de las tres mezclas aumentó a 6,71 ±0,02.

Los antígenos individuales trajeron iones fosfato residuales a la mezcla a partir de su propio PBS. Los iones fosfato algunas veces estuvieron presentes en concentraciones entre 3 y 5 mM en la mezcla antigénica combinada. En presencia de estas altas concentraciones de tampón de fosfato residual, fue difícil estabilizar el pH dentro del intervalo 6,0 a 7,0, incluso con histidina 5 mM. Cuando la histidina aumentó a 10 mM, sin embargo, el pH se estabilizó. Por otra parte, los antígenos permanecieron adsorbidos después de 1 mes de almacenamiento a 2-8°C o a 36-38°C.

Ejemplo 7

Adsorción del sacárido antígeno del meningococo A

La referencia 94 desvela conjugados de CRM₁₉₇ de oligosacáridos capsulares del meningococo serogrupo A. Los conjugados no son completamente estables y en consecuencia se preparan en forma liofilizada, lista para la reconstitución en el momento de la administración. La forma liofilizada se preparó para tener los componentes que dan la siguiente composición después de la reconstitución en una dosis unitaria:

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

Esta composición no tiene adyuvante, por eso se preparó un adyuvante para su reconstitución:

Componente	Concentración
Oxihidróxido de aluminio	0,68 mg de Al ³⁺ /ml
Tampón de histidina	10 mM
Cloruro de sodio	9 mg/ml
Tween 80	0,005%
pH	7,2±0,05
*hidroxifosfato amorfo, relación molar PO ₄ /Al entre 0,84 y 0,92	

ES 2 334 495 T3

Ejemplo 8

Adsorción de los antígenos W135 e Y de tipo sacárido del meningococo C

- 5 La referencia 94 desvela conjugados de CRM₁₉₇ de los oligosacáridos capsulares W135 e Y del meningococo de serogrupo C. Se preparó una mezcla trivalente de los tres conjugados adsorbidos en un adyuvante de oxihidróxido de aluminio (2 mg/ml) o un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio (0,6 mg de Al³⁺/ml). Las composiciones de las dos mezclas trivalentes fueron las siguientes:

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

- 35 Para la formulación de oxihidróxido/histidina, la estabilidad de los componentes sacáridos en la mezcla a granel o después del envasado en los viales fue la siguiente:

40	Tiempo (días)	Almacenado a 2-8°C		Almacenado a 36-38°C	
45		Sacárido libre (µg/ml)	% de sacárido libre	Sacárido libre (µg/ml)	% de sacárido libre
50	Granel de MenC				
	0	<1,2	<6	<1,2	<6
55	15	<1,2	<6	<1,2	<6
	30	<1,2	<6	<1,2	<6
60	Viales de MenC				
	0	<1,2	<6	<1,2	<6
	15	<1,2	<6	<1,2	<6
65	30	<1,2	<6	1,3	6,6
	Granel de MenW135				

ES 2 334 495 T3

0	2,5	12,5	2,5	12,5
15	2,3	11,4	3,4	16,8
30	2,3	11,5	3,5	17,3
Viales de MenW135				
0	2,1	10,6	2,1	10,6
15	2,3	11,7	2,7	13,3
30	2,0	10,2	3,3	16,3
Granel de MenY				
0	1,7	8,3	1,7	8,3
15	<1,3	<6,3	2,0	10,2
30	1,3	6,3	2,4	12,2
Viales de MenY				
0	1,4	7,1	1,4	7,1
15	1,5	7,6	2,1	10,7
30	1,3	6,3	2,9	14,3

Por lo tanto, los niveles de sacárido libre son estables durante al menos 1 mes a 2-8°C, antes y después del envasado.

En condiciones de estrés térmico, se observan pequeños incrementos en el sacárido libre con el tiempo para MenW135 y MenY, pero MenC permanece estable.

Durante los 30 días, el pH de los viales y el granel se mantuvo estable a $7,15 \pm 0,05$ para ambas temperaturas de almacenamiento.

Ejemplo 9

Adsorción de sacáridos antígenos A, C, W135 e Y de meningococo

Las dos composiciones líquidas trivalentes del ejemplo 8 se diluyeron y se usaron 0,5 ml para reconstituir el conjugado de MenA liofilizado del ejemplo 7. La mezcla tetravalente resultante se administró a diez ratones Balb/c (hembras de 6-8 semanas) por grupo por inyección subcutánea en los días 0 y 28. La mezcla contenía $2 \mu\text{g}$ de cada conjugado de sacárido por dosis, que representa 1/5 de la dosis humana única (SHD). Los controles fueron solución salina o polisacáridos homólogos no conjugados. Se realizaron sangrados antes de la inmunización y posteriormente el día 42, con sueros almacenados a -70°C.

ES 2 334 495 T3

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

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

En consecuencia, normalmente los títulos son más altos en los grupos de oxihidróxido de aluminio + histidina. Los títulos bactericidas séricos también fueron mejores en los grupos de oxihidróxido de aluminio + histidina.

En experimentos paralelos, se inmunizaron ratones como se describió anteriormente pero las composiciones de vacuna contenían diferentes relaciones de diversos conjugados de oligosacáridos. Se usó el oligo-conjugado de MenA liofilizado en todos los experimentos. Los títulos de ELISA fueron los siguientes:

Cantidad de Antígeno (µg/ dosis)				Adyuvante de aluminio	GMT ELISA (95% de intervalo de confianza)			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
4	2	2	2	Hidroxifosfato	177 (107-291)	367 (263-510)	239 (135-424)	239 (184-311)
4	2	2	2	Oxihidróxido	390 (313-486)	494 (345-706)	338 (266-430)	158 (96-260)
2	2	2	2	Hidroxifosfato	132 (59-296)	582 (268-1155)	143 (75-272)	247 (152-400)
2	2	2	2	Oxihidróxido	337 (239-476)	569 (462-679)	171 (117-251)	100 (59-169)

ES 2 334 495 T3

Se realizó un segundo conjunto de experimentos usando una dosis de 2 $\mu\text{g/ml}$ de sacárido para MenA y MenC, la mitad de la dosis que para MenY, y un cuarto de la dosis para MenW135. Los títulos de ELISA fueron los siguientes:

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

En consecuencia, al menos para los serogrupos A, C y W135, la formulación de oxihidróxido + histidina generalmente da mejores títulos que el hidroxifosfato en estas relaciones de antígeno diferentes.

Se entenderá que la invención se ha descrito sólo a modo de ejemplo.

Referencias

- 1 - Vaccine Design: subunit & adjuvant approach (1995) Powell & Newman (ISBN: 030644867X)
- 2 - Solicitud de patente internacional WO93/24148.
- 3 - Solicitud de patente internacional WO97/00697.
- 4 - Solicitud de patente internacional WO99/48525.
- 5 - **Burrell et al.** (2000) *Vacuna* 18: 2188-2192.
- 6 - **Burrell et al.** (1999) *Vacuna* 17: 2599-2603.
- 7 - **Corbel** (1996) *Dev Biol Stand* 87: 113-124.
- 8 - **Sturgess et al.** (1999) *Vacuna* 17: 1169-1178.
- 9 - Solicitud de patente internacional WO99/24578.
- 10 - Solicitud de patente internacional WO99/36544.
- 11 - Solicitud de patente internacional WO99/57280.
- 12 - Solicitud de patente internacional WO00/22430.
- 13 - **Tettelin et al.** (2000) *Science* 287: 1809-1815.
- 14 - Solicitud de patente internacional WO96/29412.
- 15 - **Pizza et al.** (2000) *Science* 287: 1816-1820.
- 16 - Solicitud de patente internacional WO01/52885.
- 17 - **Bjune et al.** (1991) *Lancet* 338 (8775): 1093-1096.
- 18 - **Fukasawa et al.** (1999) *Vacuna* 17: 2951-2958.

ES 2 334 495 T3

- 19 - **Rosenqvist et al.** (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92: 323-333.
- 20 - **Costantino et al.** (1992) *Vacuna* 10: 691-698.
- 5 21 - **Costantino et al.** (1999) *Vacuna* 17: 1251-1263.
- 22 - **Watson** (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 331-332.
- 23 - **Rubin** (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 269-285, v.
- 10 24 - **Jedrzejewski** (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 187-207.
- 25 - **Gustafsson et al.** (1996) *N. Engl. J. Med.* 334: 349-355.
- 15 26 - **Rappuoli et al.** (1991) *TIBTECH* 9: 232-238.
- 27 - **Vaccines** (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- 28 - **Del Giudice et al.** (1998) *Molecular Aspects de Medicine* 19: 1-70.
- 20 29 - Solicitud de patente internacional WO93/18150.
- 30 - Solicitud de patente internacional WO99/53310.
- 25 31 - Solicitud de patente internacional WO98/04702.
- 32 - Solicitud de patente internacional WO02/02606.
- 33 - **Kalman et al.** (1999) *Nature Genetics* 21: 385-389.
- 30 34 - **Read et al.** (2000) *Nucleic Acids Res* 28: 1397-406.
- 35 - **Shirai et al.** (2000) *J. Infect. Dis.* 181 (Suppl 3): S524-S527.
- 35 36 - Solicitud de patente internacional WO99/27105.
- 37 - Solicitud de patente internacional WO00/27994.
- 38 - Solicitud de patente internacional WO00/37494.
- 40 39 - Solicitud de patente internacional WO99/28475.
- 40 - **Ross et al.** (2001) *Vacuna* 19: 4135-4142.
- 45 41 - **McMichael** (2000) *Vacuna* 19 Suppl 1: S101-107.
- 42 - **Schuchat** (1999) *Lancet* 353 (9146): 51-6.
- 43 - Solicitud de patente internacional WO02/34771.
- 50 44 - **Dale** (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13: 227-43, viii.
- 45 - **Ferretti et al.** (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- 55 46 - **Kuroda et al.** (2001) *Lancet* 357 (9264): 1225-1240; ver también las páginas 1218-1219.
- 47 - *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39: 85-100.
- 48 - **Demicheli et al.** (1998) *Vacuna* 16: 880-884.
- 60 49 - **Stepanov et al.** (1996) *J Biotechnol* 44: 155-160.
- 50 - **Bell** (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 1187-1188.
- 65 51 - **Iwarson** (1995) *APMIS* 103: 321-326.
- 52 - **Gerlich et al.** (1990) *Vacuna* 8 Suppl: S63-68 & 79-80.

ES 2 334 495 T3

- 53 - **Hsu et al.** (1999) *Clin Liver Dis* 3: 901-915.
- 54 - **Sutter et al.** (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 287-308.
- 55 - **Zimmerman & Spann** (1999) *Am Fam Physician* 59: 113-118, 125-126.
- 56 - **Dreesen** (1997) *Vacuna* 15 Suppl: S2-6.
- 57 - *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16; 47 (1): 12, 19.
- 58 - **Ingram** (2001) *Trends Neurosci* 24: 305-307.
- 59 - **Rosenberg** (2001) *Nature* 411: 380-384.
- 60 - **Moingeon** (2001) *Vacuna* 19: 1305-1326.
- 61 - **Ramsay et al.** (2001) *Lancet* 357 (9251): 195-196.
- 62 - **Lindberg** (1999) *Vacuna* 17 Suppl 2:S28-36.
- 63 - **Buttery & Moxon** (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- 64 - **Ahmad & Chapnick** (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- 65 - **Goldblatt** (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567. 5
- 66 - Patente europea 0 477 508.
- 67 - Patente estadounidense 5.306.492.
- 68 - Solicitud de patente internacional WO98/42721.
- 69 - Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, en particular vol. 10:48-114.
- 70 - **Hermanson** (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 o 012342335X.
- 71 - Solicitud de patente europea 0372501.
- 72 - Solicitud de patente europea 0378881.
- 73 - Solicitud de patente europea 0427347.
- 74 - Solicitud de patente internacional WO93/17712.
- 75 - Solicitud de patente internacional WO98/58668.
- 76 - Solicitud de patente europea 0471177.
- 77 - Solicitud de patente internacional WO00/56360.
- 78 - Solicitud de patente internacional WO00/61761.
- 79 - **Robinson & Torres** (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
- 80 - **Donnelly et al.** (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
- 81 - **Scott-Taylor & Dalgleish** (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
- 82 - **Apostolopoulos & Plebanski** (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
- 83 - **Ilan** (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
- 84 - **Dubensky et al.** (2000) *Mol Med* 6:723-732.
- 85 - **Robinson & Pertmer** (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
- 86 - **Donnelly et al.** (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S 190-193.

ES 2 334 495 T3

87 - **Davis** (1999) Mt Sinai J Med 66:84-90.

88 - **Gennaro** (2000) Remington: *The Science and Practice de Pharmacy*. 20th edición, ISBN: 0683306472.

5 89 - WO93/13202.

90 - Solicitud de patente internacional WO01/64922.

10 91 - Solicitud de patente internacional WO03/010194.

92 - Solicitud de patente internacional WO01/64920.

94 - Solicitud de patente internacional WO003/007985.

15 95 - Solicitud de patente internacional WO00/57906.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una composición inmunogénica que comprende una mezcla de uno o más antígenos, una sal de aluminio e histidina, en el que el procedimiento comprende: una primera etapa de mezclar (i) la sal de aluminio y (ii) histidina, para dar una mezcla de histidina/sal de aluminio; y una segunda etapa de mezclar (i) dicha mezcla de histidina/sal de aluminio y (ii) uno o más antígenos, en el que uno o más antígeno(s) se adsorbe(n) a la sal de aluminio y en el que el antígeno es un antígeno bacteriano seleccionado del grupo que consiste en:

- un antígeno proteico de *N. meningitidis*;
- una preparación de vesícula de membrana exterior (OMV) de *N. meningitidis*;
- un sacárido antígeno de *N. meningitidis*.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antígeno es del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sacárido antígeno es un sacárido antígeno conjugado.

4. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la sal de aluminio es un hidróxido o un fosfato, o una mezcla de dos o más de dichas sales.

5. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la sal de aluminio es hidroxifosfato de aluminio y el antígeno es un antígeno ácido.

6. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la concentración de histidina de la composición está entre 1 mM y 100 mM.

7. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la concentración de histidina de la composición está entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 10 mM.

8. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la composición además comprende una sal de sodio.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la concentración de la sal de sodio está entre aproximadamente 2,5 mM y aproximadamente 5 mM.

10. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el pH de la composición está entre 6 y 7.

11. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la composición además comprende más de un antígeno.

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que más de un antígeno se adsorbe en una sal de aluminio.

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, que comprende 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de los siguientes: un antígeno de *Bordetella pertussis*; un antígeno de difteria; un antígeno del tétanos; un antígeno del virus de la hepatitis B; un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae*; virus de polio inactivado; y un sacárido antígeno del *N. meningitidis* serogrupo C.

15. Una composición inmunogénica que consiste en una mezcla de (i) uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en un antígeno proteico de *N. meningitidis*; una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) de *N. meningitidis* y un sacárido antígeno de *N. meningitidis*, (ii) una sal de aluminio y (iii) histidina, en el que uno o más antígenos se adsorben a la sal de aluminio, que se puede obtener por un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15 para su uso como medicamento.

17. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el medicamento es una vacuna.

18. El uso de la composición de acuerdo con la reivindicación 15 en la fabricación de un medicamento para originar una respuesta inmune en un mamífero contra el/los antígeno(s).

ES 2 334 495 T3

19. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el medicamento es una vacuna.

20. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el mamífero es un ser humano.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

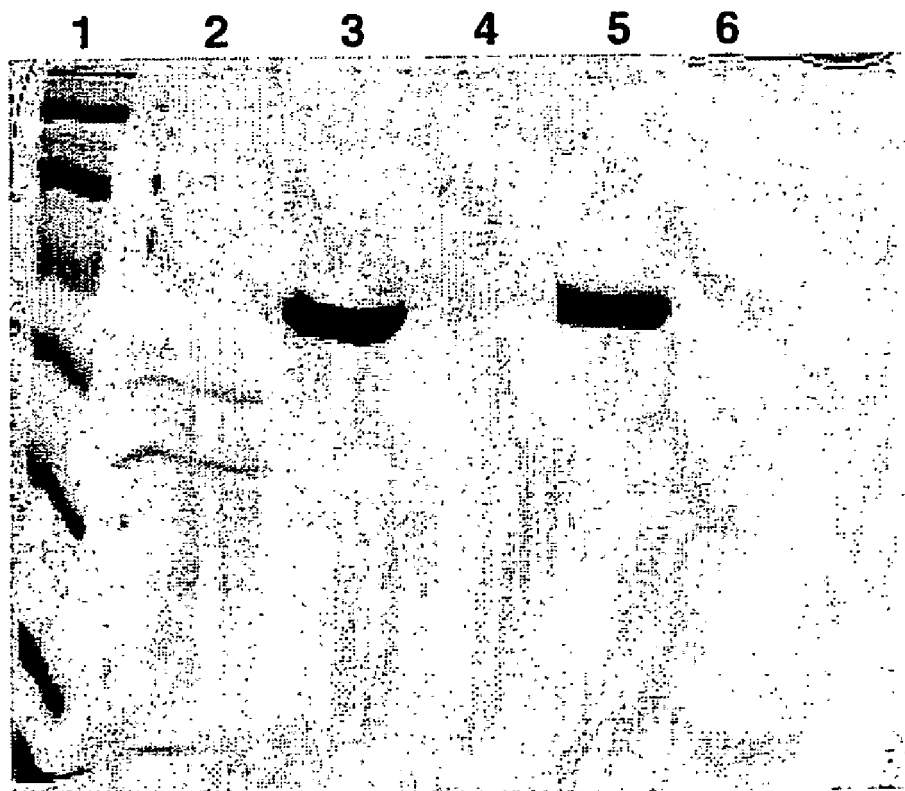


Figura 2

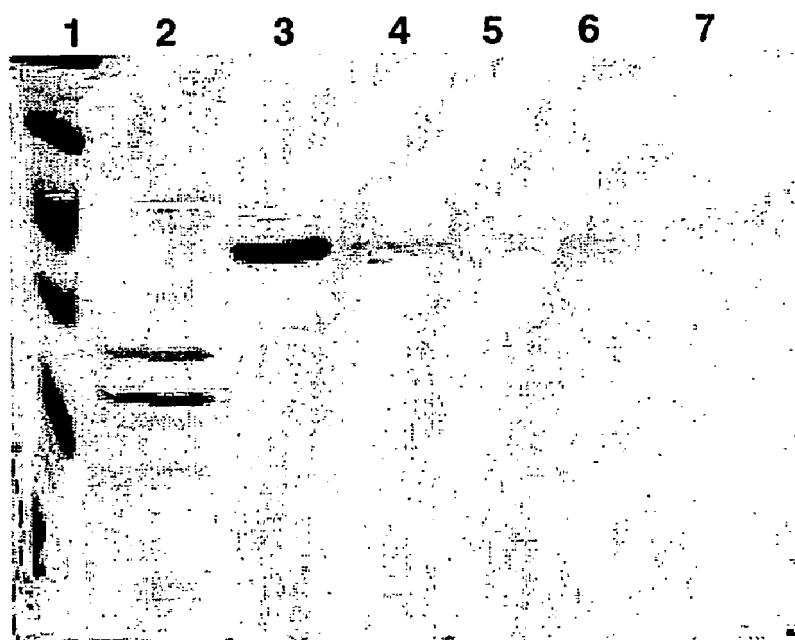


Figura 3

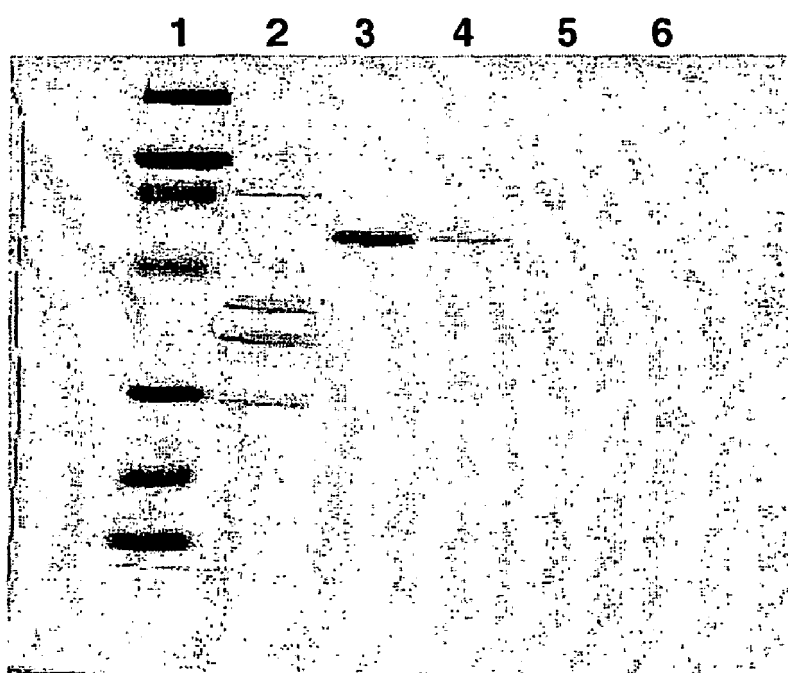


Figura 4

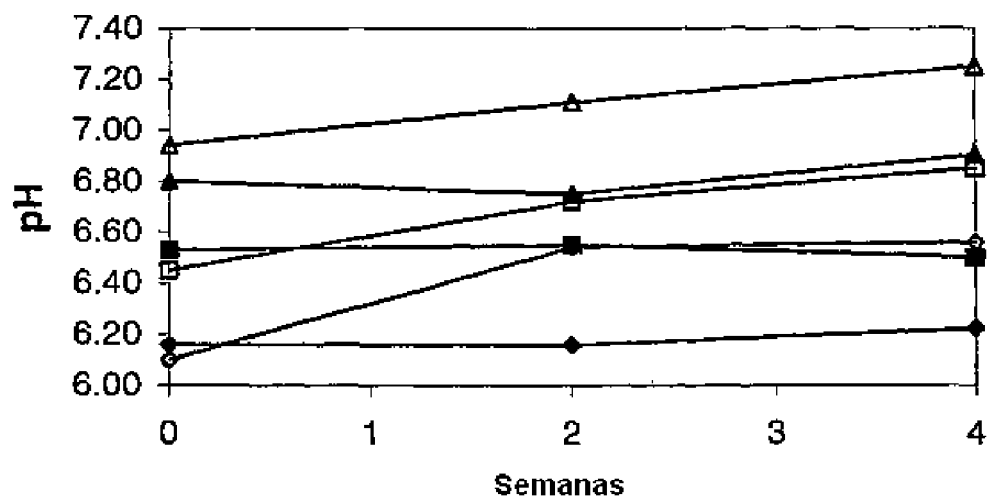


Figura 5

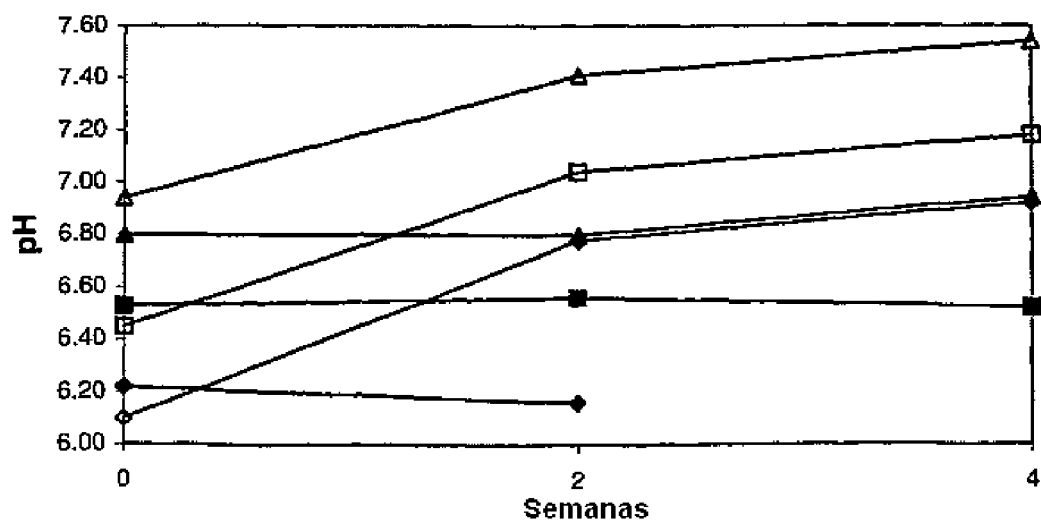


Figura 6

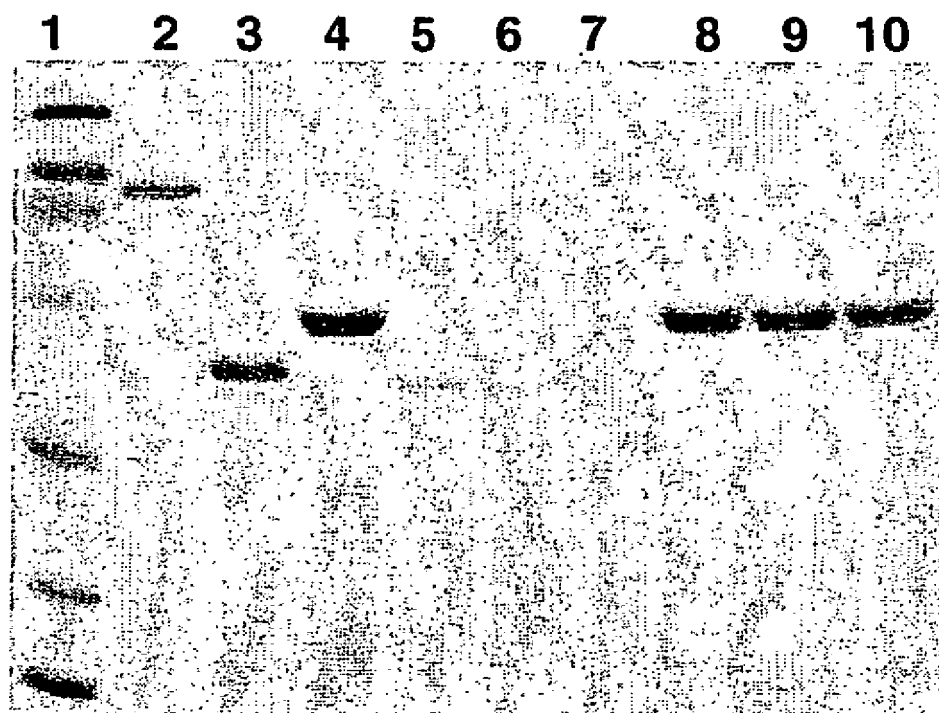


Figura 7

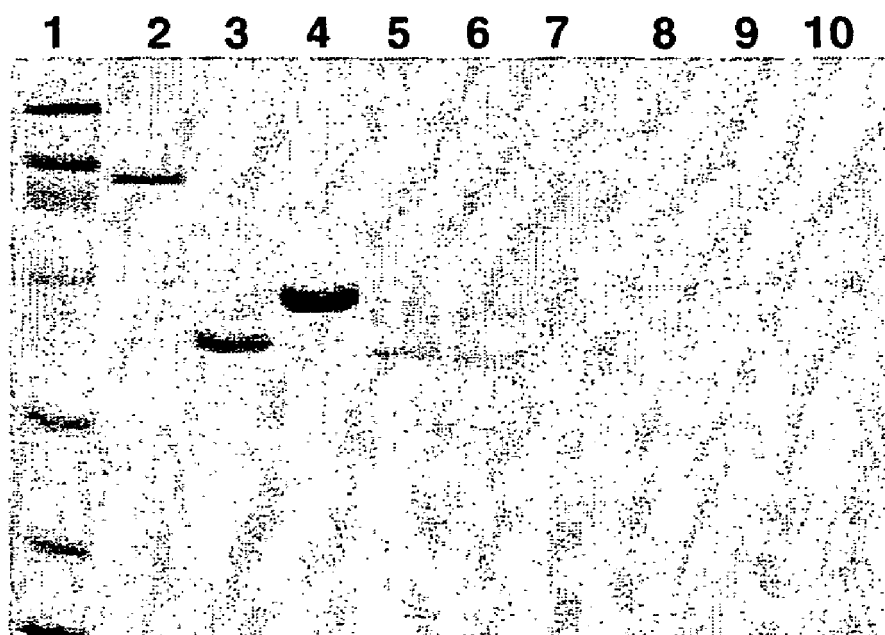


Figura 8

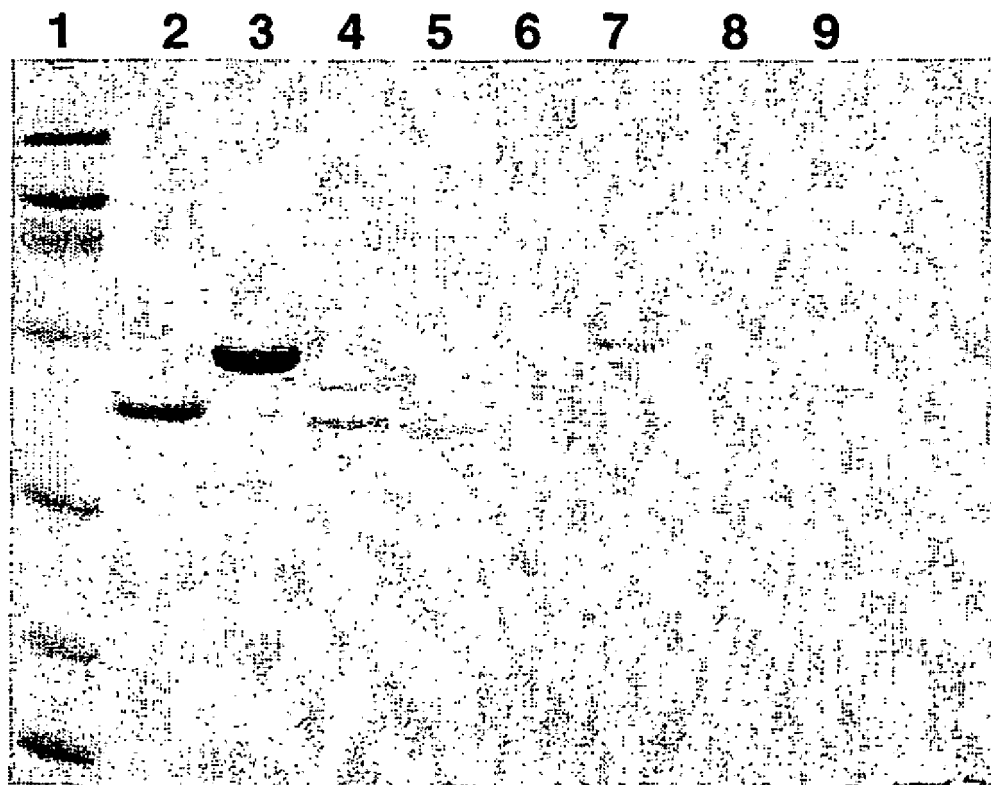


Figura 9

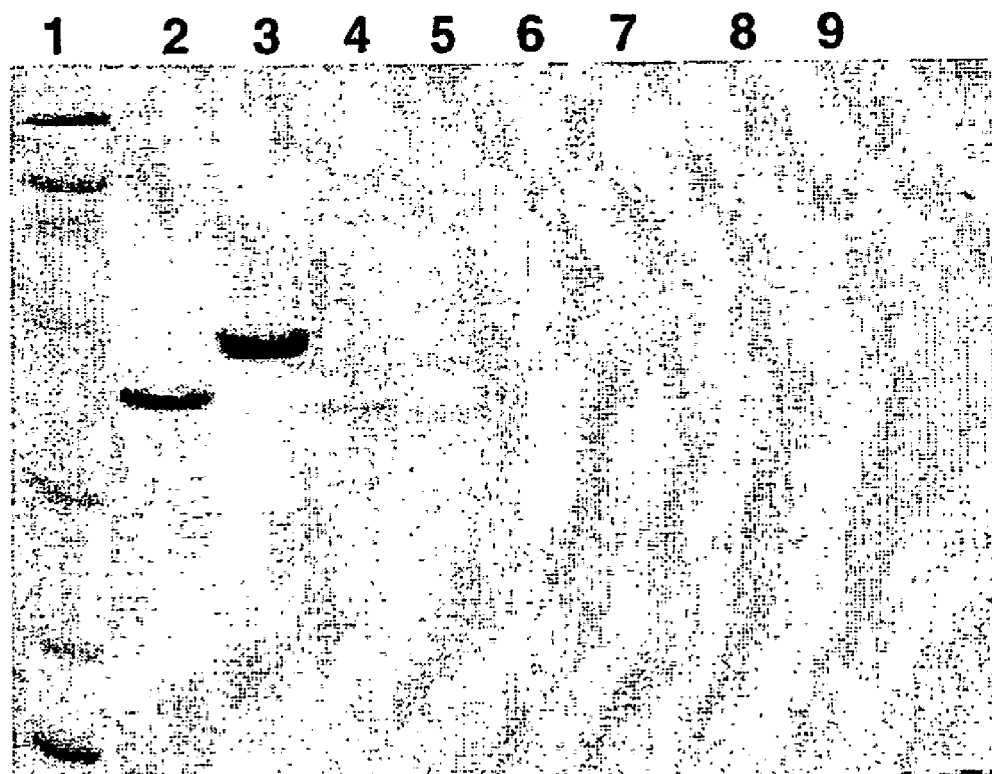


Figura 10

