



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 806**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/10** (2006.01)

**A61K 39/116** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

**C07K 14/235** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03078355 .9**

96 Fecha de presentación : **02.05.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **1393744**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2004**

54

Título: **Vacunas contra la tos ferina acelulares y procedimientos de preparación de las mismas.**

30

Prioridad: **04.05.1995 US 433646**  
**12.07.1995 US 501743**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.05.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.05.2011**

73

Titular/es: **SANOFI PASTEUR LIMITED**  
**Connaught Campus 1755 Steeles Avenue West**  
**Toronto, ON M2R 3T4, CA**

72

Inventor/es: **Vose, John R.;**  
**Fahim, Raafat E.;**  
**Jackson, Gail E.D.;**  
**Tan, Larry U.L.;**  
**Herbert, Andrew;**  
**Boux, Leslie;**  
**Barreto, Luis;**  
**Thippawong, John y**  
**Klein, Michael H.**

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 359 806 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 contra la tos ferina acelulares y procedimientos de preparación de las mismas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a vacunas contra la tos ferina acelulares, a sus componentes y a su preparación.

10 **Referencia a la solicitud relacionada**

La presente solicitud es una continuación en parte de la solicitud de patente US nº 08/501.743 en trámite presentada el 12 de julio de 1995, que a su vez es una continuación en parte de la solicitud de patente US nº 08/433.646 en trámite presentada el 4 de mayo de 1995.

15 **Antecedentes de la invención**

La tos ferina o coqueluche es una infección grave, del aparato respiratorio superior muy contagiosa producida por *Bordetella pertussis*. La Organización Mundial de la salud estima que existen 60 millones de casos de tos ferina al año y 0,5 a 1 millón de muertes asociadas (ref. 1). En la presente memoria se hace referencia a varias referencias entre paréntesis para describir completamente el estado de la técnica a la que corresponde la presente invención. Toda la información bibliográfica de cada cita se encuentra al final de la memoria. En las poblaciones sin vacunar, se ha observado una incidencia de tos ferina hasta del 80% en niños menores de 5 años (ref. 2). Aunque la tos ferina se considera generalmente que es una enfermedad de la infancia, existen pruebas crecientes de enfermedad clínica y asintomática en adolescentes y adultos (refs. 3, 4 y 5).

La introducción de vacunas con células completas compuestas de cantidades eficaces de organismos de *B. pertussis* inactivados química y térmicamente en la década de 1940 fue responsable de una reducción drástica en el número de casos de tos ferina producida por *B. pertussis*. Los índices de eficacia de las vacunas de células completas se han estimado en hasta el 95% dependiendo de la definición del caso (ref. 6). Aunque la infección con *B. pertussis* proporciona inmunidad de larga duración, existen pruebas crecientes de disminución de la protección después de la inmunización con vacunas de células completas (ref. 3). Varios informes que citan una relación entre la vacunación antitosferínica con células completas, la reactogenicidad y efectos secundarios graves condujeron a una disminución de la aceptación de la vacuna y epidemias renovadas consiguientes (ref. 7). Más recientemente se han desarrollado vacunas contra la tos ferina de componente definido.

Antígenos para vacunas contra la tos ferina definidas

Se han desarrollado varias vacunas contra la tos ferina acelulares e incluyen los antígenos de *Bordetella pertussis*. La toxina de la tos ferina (PT), la hemoaglutinina filamentosas (HAF), la proteína de la membrana externa de 69 kDa (pertactina) y los aglutinógenos fimbriales (véase la tabla 1 a continuación. Las tablas aparecen al final de la memoria).

Toxina de la tos ferina

La toxina de la tos ferina es una exotoxina que es un miembro de la familia A/B de las toxinas bacterianas con actividad de ADP-ribosiltransferasa (ref. 8). El resto A de estas toxinas presenta la actividad de ADP-ribosiltransferasa y la fracción B interviene en la unión de la toxina a los receptores celulares del huésped y la traslocación de A a su punto de acción. El PT se facilita asimismo la adherencia de *B. pertussis* a las células epiteliales ciliadas (ref. 9) y también desempeña una función en la invasión de macrófagos por *B. pertussis* (ref. 10).

Todas las vacunas contra la tos ferina acelulares tienen incluido PT, lo que se ha propuesto como un factor de virulencia principal y antígeno protector (refs. 11, 12). La infección natural con *B. pertussis* genera respuestas a PT tanto humorales como mediadas por las células (refs. 13 a 17). Los lactantes tienen anticuerpos anti-PT obtenidos a través de la placenta (refs. 16, 18) y los anticuerpos anti-PT que contiene el calostro humano resultaban eficaces en la protección pasiva de ratones contra la infección por aerosol (ref. 19). Una respuesta inmunitaria mediada por células (IMC) a subunidades PT se ha demostrado después de la inmunización con una vacuna acelular (ref. 20) y una repuesta IMC al PT se generó después de la vacunación con células completas (ref. 13). El PT inactivado químicamente en vacunas de células completas o de componente es protector 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).

Los principales efectos patofisiológicos del PT son debidos a su actividad de ADP-ribosiltransferasa. El PT cataliza la transferencia de la ADP-ribosa del NAD a la proteína de unión del nucleótido guanina G<sub>1</sub>, destruyendo así el sistema celular regulador de la adenilato ciclasa (ref. 24). PT además evita la migración de macrófagos y linfocitos a zonas de inflamación e interfiere con la fagocitosis mediada por neutrófilos y la destrucción de bacterias (ref. 25). Se han utilizado numerosos ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la actividad enzimática de S1 y/o PT, incluyendo la

ribosilación con ADP de la transducina bovina (ref. 26), el ensayo de agrupamiento de células del ovario de hámster chino (CHO) (ref. 27), la sensibilización con histamina (ref. 28), la leucocitosis y la NAD glucohidrolasa. Cuando se exponen al PT, las células CHO desarrollan una morfología agrupada característica. Este fenómeno depende de la unión de PT y el posterior traslado y actividad de ADP-ribosiltransferasa de S1 y de este modo el ensayo de agrupamiento de células CHO se utiliza extensamente para probar la integridad y toxicidad de las holotoxinas del PT.

#### Hemoaglutinina filamentosa

La hemoaglutinina filamentosa es un polipéptido largo (220 kDa) inocuo que media en el acoplamiento de *B. pertussis* a células ciliadas del aparato respiratorio superior durante la colonización bacteriana (refs. 9, 29). La infección natural produce anticuerpos anti-HAF e inmunidad mediada por células (refs. 13, 15, 17, 30 y 31). Los anticuerpos anti-HAF se encuentran en el calostro humano y se transmiten también a través de la placenta (refs. 17, 18 y 19). La vacunación con vacunas contra la tos ferina con células completas o acelulares genera anticuerpos anti-HAF y vacunas acelulares que contienen HAF también provocan una respuesta IMC a HAF (refs. 20, 32). HAF es un antígeno protector en un modelo de prueba de provocación respiratorio en ratón después de la inmunización activa o pasiva (refs. 33, 34). Sin embargo, HAF solo no protege en el ensayo de potencia de la prueba de provocación intracerebral en el ratón (ref. 28).

#### Proteína de la membrana externa de 69 kDa (Pertactina)

La proteína de 69 kDa es una proteína de la membrana externa que fue identificada originalmente en *B. bronchiseptica* (ref. 35). Se demostró que es un antígeno protector contra *B. bronchiseptica* y se identificó posteriormente tanto en *B. pertussis* como en *B. parapertussis*. La proteína de 69 kDa se une directamente a células eucarióticas (ref. 36) y la infección natural con *B. pertussis* provoca una respuesta humoral anti-P.69 (ref. 14) y P.69 provoca también una respuesta inmunitaria mediada por células (refs. 17, 37, 38). La vacunación con vacunas de células completas o acelulares produce anticuerpos anti-P.69 (refs. 32, 39) y las vacunas acelulares producen P.69 IMC (ref. 39). La pertactina protege contra la prueba de provocación por aerosol con *B. pertussis* (ref. 40) y en combinación con HAF, protege en la prueba de provocación intracerebral contra *B. pertussis* (ref. 41). La transferencia pasiva de anticuerpos anti-P.69 policlonales o monoclonales también protege a los ratones contra la prueba de provocación por aerosol (referencia 42).

#### Aglutinógenos

Los serotipos de *B. pertussis* están definidos por sus fimbrias aglutinantes. La OMS recomienda que las vacunas de células completas incluyan aglutinógenos (Agg) de los tipos 1, 2 y 3 ya que no son protectores cruzados (ref. 43). Agg 1 no es fimbrial y se encuentra en todas las cepas de *B. pertussis* mientras que Agg de los serotipos 2 y 3 son fimbriales. La infección natural o la inmunización con vacunas de células completas o acelulares producen anticuerpos anti-Agg (refs. 15, 32). Una respuesta inmunitaria específica mediada por células puede generarse en ratones por Agg 2 y Agg 3 después de la infección con aerosol (ref. 17). Agg 2 y 3 son protectoras en ratones frente a la prueba de provocación respiratoria y el calostro humano que contiene anti-aglutinógenos protegerá también en este ensayo (refs. 19, 44, 45).

#### Vacunas acelulares

La primera vacuna acelular desarrollada fue la vacuna de dos componentes PT + HAF (JNIH 6) de Sato *et al.* (ref. 46). Esta vacuna se preparó por purificación conjunta de PT y antígenos HAF procedentes del sobrenadante del cultivo de la cepa Tohama de *B. pertussis*, seguido de formación del toxoide en formalina. Las vacunas acelulares de varios fabricantes y de varias composiciones se han utilizado con éxito desde 1981 para inmunizar niños japoneses contra la tos ferina dando como resultado una drástica disminución del número de casos de la enfermedad (ref. 47). La vacuna JNIH 6 y una vacuna monocomponente del toxoide PT (JNIH 7) se probaron en una prueba clínica prolongada en Suecia en 1986. Los resultados iniciales indicaron menor eficacia que la eficacia publicada de una vacuna de células completas, pero los estudios siguientes han demostrado ser más eficaces contra la enfermedad más leve diagnosticada por procedimientos serológicos (refs. 48, 49, 50, 51). Sin embargo, había pruebas para la reversión a la toxicidad del PT inactivado con formalina en estas vacunas. Se observó también que estas vacunas protegen contra la enfermedad con preferencia a la infección.

Actualmente se están evaluando numerosas vacunas contra la tos ferina acelulares nuevas las cuales incluyen combinaciones de PT, HAF, P.69 y/o aglutinógenos y éstas se listan en la tabla 1. Se han utilizado varias técnicas de desintoxicación química para PT incluyendo la inactivación con formalina (ref. 46), glutaraldehído (ref. 52), peróxido de hidrógeno (ref. 53) y tetranitrometano (ref. 54).

Por lo tanto, las vacunas contra la tos ferina acelulares disponibles en el comercio actuales pueden no contener formulaciones apropiadas de antígenos apropiados en formas inmunógenas apropiadas para conseguir un nivel deseado de eficacia en una población humana sensible a la tos ferina.

La ref. 67 describe una nueva vacuna antitosferínica acelular (AP) de cinco componentes que contiene 10 µg de toxoide de la tos ferina, 5 µg de hemoaglutinina filamentosa, 5 µg de aglutinógenos 2 y 3 combinados y 3 µg de pertactina que fue evaluada en adultos y niños para seguridad pero no eficacia.

- 5 Sería deseable proporcionar vacunas contra la tos ferina acelulares eficaces que contengan cantidades relativas seleccionadas de antígenos seleccionados y procedimientos de producción de las mismas.

La presente invención proporciona la utilización de la forma purificada de toxoide de la tos ferina, hemoaglutinina filamentosa, pertactina y aglutinógenos fimbriales de *B. pertussis* en la elaboración de una preparación de vacuna de combinación contra la enfermedad causada por *B. pertussis* para la administración a una población humana en situación de riesgo de enfermedad causada por *B. pertussis* para proporcionar protección para la enfermedad causada por *B. pertussis* en la que cada dosis humana individual de preparación de la vacuna contiene los siguientes antígenos de tos ferina, a saber de 5 a 30 µg de nitrógeno de dicho toxoide de la tos ferina, 5 a 30 µg de nitrógeno de dicha hemoaglutinina filamentosa, de 3 a 15 µg de nitrógeno de pertactina y de 1 a 10 µg de nitrógeno de aglutinógenos 2 (Agg2) y 3 (Agg3) fimbrial y en la que la relación en peso de Agg2 a Agg3 es de 1,5:1 a 2:1 y en el que dicha preparación de la vacuna proporciona dicha protección a la enfermedad causada por *B. pertussis* en al menos el 70% de los miembros de una población en situación de riesgo determinable por una prueba de eficacia clínica y en la que dicha vacuna está sustancialmente exenta de aglutinógeno fimbrial 1.

20 La preparación inmunógena puede comprender por lo menos otro antígeno de *Bordetella*. Por lo menos otro antígeno de *Bordetella* puede ser hemoaglutinina filamentosa, la adenilato ciclasa de la proteína de la membrana externa de 69 kDa. La oligopolisacárido de *Bordetella*, las proteínas de la membrana externa y la toxina de la tos ferina o un toxoide de la misma, incluyendo los análogos genéticamente desintoxicados de la misma.

25 La preparación de la vacuna anterior puede comprender por lo menos otro inmunógeno de no *Bordetella*. Dicho otro inmunógeno no *Bordetella* puede ser el toxoide diftérico, el toxoide tetánico, polisacáridos capsulares de *Haemophilus*, la proteína de la membrana externa de *Haemophilus*, el antígeno de la superficie de la hepatitis B, poliomeilitis, paperas, sarampión y/o rubéola.

30 Las preparaciones de la vacuna pueden comprender además un adyuvante y dicho adyuvante puede ser fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, Quil A, QS21, fosfato cálcico, fosfato cálcico, hidróxido de zinc, un análogo de glucolípido, un éster octodecílico de un aminoácido o una lipoproteína.

35 Se describe una vacuna que puede comprender el toxoide de la tos ferina, hemoaglutinina filamentosa, la proteína de 69 kDa y aglutinógenos filamentosos de *Bordetella* en una relación en peso de aproximadamente 10:5:5:3 proporcionada por aproximadamente 10 µg de toxoide de la tos ferina, aproximadamente 5 µg de hemoaglutinina filamentosa, aproximadamente 5 µg de proteína de 69 kDa y aproximadamente 3 µg de aglutinógenos fimbriales en una sola dosis humana. Se describe una vacuna que puede comprender toxoide de la tos ferina, hemoaglutinina filamentosa, proteína de 69 kDa y aglutinógenos fimbriales en una relación en peso de aproximadamente 20:20:5:3 proporcionada por aproximadamente 20 µg de toxoide de la tos ferina, aproximadamente 20 µg de hemoaglutinina filamentosa, aproximadamente 5 µg de proteína de 69 kDa y aproximadamente 3 µg de aglutinógenos fimbriales en una sola dosis humana. Se describe una vacuna que puede comprender toxoide de la tos ferina, hemoaglutinina filamentosa, proteína de 69 kDa y aglutinógenos fimbriales en una relación en peso de aproximadamente 20:10:10:6 proporcionada por aproximadamente 20 µg de toxoide de la tos ferina, aproximadamente 10 µg de hemoaglutinina filamentosa, aproximadamente 10 µg de proteína de 69 kDa y aproximadamente 6 µg de aglutinógenos fimbriales en una sola dosis humana.

50 La extensión de la protección a la población humana en situación de riesgo proporcionada por la preparación de la vacuna de la invención puede ser por lo menos de aproximadamente 80%, preferentemente alrededor del 85%, para un caso de tos espasmódica de duración por lo menos de 21 días e infección bacteriana confirmada por cultivo. La extensión de la protección a la población humana en situación de riesgo puede ser por lo menos de aproximadamente 70% para el caso de tos ferina leve con una tos de por lo menos un día de duración.

55 El componente de aglutinógenos de la preparación de vacuna comprenderá aglutinógeno 2 fimbrial (Agg 2) y aglutinógeno 3 fimbrial (Agg 3) con preferencia sustancialmente exento de aglutinógeno 1. La relación en peso de Agg 2 a Agg3 puede ser de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 2:1.

60 La preparación de la vacuna en la presente memoria puede combinarse con el toxoide tetánico y el toxoide diftérico para proporcionar una vacuna de DTP. En una forma de realización, la vacuna contiene aproximadamente 15 Lfs de toxoide diftérico y aproximadamente 5 Lfs del toxoide tetánico.

Además, la preparación de vacuna puede comprender también un adyuvante, particularmente alumbre.

65 Pueden utilizarse en la preparación de una sola dosis humana de la preparación de la vacuna desde aproximadamente 30 µg de nitrógeno de pertactina y aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg de nitrógeno de los aglutinógenos fimbriales. En particular, la preparación de vacuna tal como se proporciona en la presente

memoria ha sido seleccionada por el National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) del Gobierno de Estados Unidos para la evaluación en una prueba clínica doble a ciegas de eficacia humana, demostrando de este modo una base suficiente para los especialmente expertos en la materia de que las composiciones serán eficaces en algún grado en la prevención de la enfermedad indicada (tos ferina). El asunto de esta prueba, (que es una vacuna como la proporcionada en la presente memoria) ha cumplido con la responsabilidad de ser razonablemente predictiva de utilidad.

La presente invención se describirá a continuación únicamente a título de ejemplo, haciendo referencia al dibujo adjunto en el que:

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

Haciendo referencia a la figura 1, se ilustra un diagrama de flujo de un procedimiento para preparar una preparación de aglutinógeno procedente de una cepa de *Bordetella*. Como se aprecia en la figura 1, una pasta de células de *Bordetella* que contiene los aglutinógenos, tal como la pasta de células de *B. pertussis*, se extrae, por ejemplo, con tampón que contiene urea, tal como fosfato potásico 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) tal como por centrifugación. El precipitado residual (ppt1) se descarta. El sobrenadante clarificado (sp1) puede concentrarse a continuación y filtrarse a través de membranas frente a, por ejemplo, fosfato potásico 10 mM/NaCl 150 mM/Triton X-100 al 0,1% utilizando, por ejemplo, un filtro de membrana NMWL de 100 a 300 kDa.

El primer sobrenadante se incuba a continuación a una temperatura y durante un tiempo para producir un sobrenadante clarificado (sp2) que contiene aglutinógenos y un segundo precipitado de descarte (ppt2) que contiene contaminantes desprovistos de aglutinógeno. Las temperaturas apropiadas incluyen aproximadamente 50°C a aproximadamente 100°C, incluyendo de aproximadamente 75°C a aproximadamente 85°C y los tiempos de incubación apropiados incluyen de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 minutos. El sobrenadante clarificado se concentra a continuación, por ejemplo, mediante la adición de polietilenglicol de peso molecular de aproximadamente 8000 (PEG 8000) hasta una concentración final de aproximadamente  $4,5 \pm 0,2\%$  y agitando suavemente durante un mínimo de aproximadamente 30 minutos para producir un tercer precipitado (ppt3) que puede recogerse por centrifugación. El sobrenadante restante sp3 se descarta.

Este tercer precipitado (ppt3) se extrae, por ejemplo, con un tampón que comprende fosfato potásico 10 mM/NaCl 150 mM para proporcionar la solución que contiene aglutinógeno fimbrial en bruto. Puede añadirse fosfato potásico 1 M a la solución fimbrial en bruto para hacerla aproximadamente 100 mM con respecto al fosfato potásico. Alternativamente, el sobrenadante clarificado de los aglutinógenos fimbriales tratados térmicamente puede purificarse sin precipitación por cromatografía con filtración en gel utilizando un gel tal como Sepharose CL6B. Los aglutinógenos fimbriales en la solución en bruto se purifican a continuación por cromatografía en columna, tal como, pasándolos a través de una columna de sílice PEI, para producir la preparación del aglutinógeno fimbrial en el ensayo rápido.

Este aglutinógeno fimbrial que contiene el ensayo rápido puede estar más concentrado y filtrado a través de membranas frente, por ejemplo, a un tampón que contiene fosfato potásico 10 mM/NaCl 150 mM utilizando una membrana NMWL de 100 a 300 kDa. La preparación de aglutinógeno puede esterilizarse por filtración a través de un filtro de membrana  $\leq 0,22 \mu\text{M}$ , para proporcionar la preparación de aglutinógeno fimbrial purificado final que contiene aglutinógeno 2 y 3 fimbrial.

Una preparación de aglutinógeno de una cepa de *Bordetella* puede contener aglutinógeno 2 fimbrial (Agg 2) y aglutinógeno 3 fimbrial (Agg 3) sustancialmente exentos de aglutinógeno 1. La relación en peso de Agg 2 a Agg 3 puede ser de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 2:1. Dichas preparaciones de aglutinógeno fimbrial pueden producirse por el procedimiento proporcionado en la presente memoria y descrito con detalle anteriormente. La preparación de la vacuna contiene toxina de tos ferina o un toxoide de la misma, incluyendo análogos genéticamente desintoxicados de PT como se describe, por ejemplo, en la ref. 68.

La preparación de la vacuna puede incluir además, inmunógenos de no *Bordetella* incluyendo el toxoide diftérico, el toxoide tetánico, polisacáridos capsulares de *Haemophilus*, proteína de la membrana externa de *Haemophilus*, antígeno de superficie de la hepatitis B, poliomeilitis, paperas, sarampión y rubéola.

Cada uno de los antígenos de *Bordetella* es absorbido individualmente por el adyuvante (por ejemplo alumbre) para proporcionar producción conveniente y rápida de preparaciones de la vacuna que contienen cantidades relativas seleccionadas de antígenos para proporcionar protección en una extensión de por lo menos aproximadamente 70% de los miembros de una población en riesgo, preferentemente de por lo menos aproximadamente el 80% de dicha población.

En formas de realización específicas, las preparaciones de la vacuna presentan las características siguientes ( $\mu\text{g}$  de proteínas utilizadas en la presente memoria se basan en los resultados del análisis de Kjeldahl realizados en concentrados purificados y se expresan en  $\mu\text{g}$  de nitrógeno de proteína) y todos pueden ser administrados por inyección intramuscular:

5

(a) CP<sub>10/5/5/3</sub> DT

Una formulación del componente de la vacuna contra la tos ferina combinada con toxoides diftéricos y tetánicos se denominó CP<sub>10/5/5/3</sub>DT. Cada 0,5 ml de dosis humana de CP<sub>10/5/5/3</sub>DT se formuló para que contenga aproximadamente:

10

10  $\mu\text{g}$  Toxoide de la tos ferina (PT)  
 5  $\mu\text{g}$  Hemoaglutinina filamentosa (HAF)  
 5  $\mu\text{g}$  Aglutinógenos 2 y 3 fimbriales (FIMB)  
 15 3  $\mu\text{g}$  Proteína de la membrana externa de 69 kDa  
 15 Lf Toxoide diftérico  
 5 Lf Toxoide tetánico  
 1,5 mg Fosfato de aluminio  
 0,6% 2-fenoxietanol, como conservante

20

(b) CP<sub>20/20/5/3</sub> DT

Otra formulación del componente de la vacuna contra la tos ferina combinada con toxoides diftéricos y tetánicos se denominó CP<sub>20/20/5/3</sub>DT. Cada 0,5 ml de dosis humana de CP<sub>20/20/5/3</sub>DT se formuló para que contenga aproximadamente:

25

20  $\mu\text{g}$  Toxoide de la tos ferina (PT)  
 20  $\mu\text{g}$  Hemoaglutinina filamentosa (HAF)  
 5  $\mu\text{g}$  Aglutinógenos 2 y 3 fimbriales (FIMB)  
 30 3  $\mu\text{g}$  Proteína de la membrana externa de 69 kDa  
 15 Lf Toxoide diftérico  
 5 Lf Toxoide tetánico  
 1,5 mg Fosfato de aluminio  
 0,6% 2-fenoxietanol, como conservante

35

(c) CP<sub>10/5/5</sub> DT

Una formulación del componente de la vacuna contra la tos ferina combinada con toxoides diftéricos y tetánicos se denominó CP<sub>10/5/5</sub>DT. Cada 0,5 ml de dosis humana de CP<sub>10/5/5</sub>DT se formuló para que contenga aproximadamente:

40

10  $\mu\text{g}$  Toxoide de la tos ferina (PT)  
 5  $\mu\text{g}$  Hemoaglutinina filamentosa (HAF)  
 5  $\mu\text{g}$  Aglutinógenos 2 y 3 fimbriales (FIMB)  
 15 Lf Toxoide diftérico  
 45 5 Lf Toxoide tetánico  
 1,5 mg Fosfato de aluminio  
 0,6% 2-fenoxietanol, como conservante

50

(d) CP<sub>20/10/10/6</sub> DT

Otra formulación del componente de la vacuna contra la tos ferina combinada con toxoides diftéricos y tetánicos se denominó CP<sub>20/10/10/6</sub>DT. Cada 0,5 ml de dosis humana de CP<sub>20/10/10/6</sub>DT se formuló para que contenga aproximadamente:

55

20  $\mu\text{g}$  Toxoide de la tos ferina (PT)  
 10  $\mu\text{g}$  Hemoaglutinina filamentosa (HAF)  
 10  $\mu\text{g}$  Aglutinógenos 2 y 3 fimbriales (FIMB)  
 6  $\mu\text{g}$  Proteína de la membrana externa de 69 kDa (69 kDa)  
 15 Lf Toxoide diftérico  
 60 5 Lf Toxoide tetánico  
 1,5 mg Fosfato de aluminio  
 0,6% 2-fenoxietanol, como conservante

Los demás inmunógenos de *Bordetella*, toxina de tos ferina (incluyendo sus análogos desintoxicados genéticamente, tal como se describe, por ejemplo, en Klein *et al.*, patente US nº 5.085.862 asignada al cesionario de la misma, HAF

65

y la proteína de 69 kDa pueden producirse por varios procedimientos tales como los descritos a continuación:

#### Purificación de PT

5 El PT puede aislarse del sobrenadante del cultivo de una cepa de *B. pertussis* utilizando procedimientos convencionales. Por ejemplo, puede utilizarse el procedimiento de Sekura *et al.* (ref. 55). El PT se aísla absorbiendo en primer lugar el sobrenadante del cultivo en una columna que contiene la matriz del gel con colorante-ligando, Affi-Gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). El PT se eluye de esta columna mediante alto contenido en sal, tal como cloruro de magnesio 0,75 M y, después de eliminar la sal, se pasa a través de una columna de la matriz de afinidad fetuina-Sepharose compuesta por fetuina unida a Sepharose activada con bromuro de cianógeno. El PT se eluye de la columna con fetuina utilizando la sal de magnesio 4 M.

15 Alternativamente, puede utilizarse el procedimiento de Irons *et al.* (ref. 56). El sobrenadante del cultivo se absorbe en una columna Sepharose 4B activada con CNBr a la que se une por enlace covalente haptoglobina en primer lugar. El PT se une al absorbente a pH 6,5 y se eluye de la columna utilizando tampón Tris 0,1 M/NaCl 0,5 M mediante un cambio paso a paso a pH 10.

20 Alternativamente, puede utilizarse el procedimiento descrito en la patente US nº 4.705.686 concedida a Scott *et al.* el 10 de noviembre de 1987. En este procedimiento los sobrenadantes del cultivo o los extractos celulares de *B. pertussis* se pasan a través de una columna de una resina de intercambio aniónico de suficiente capacidad para absorber la endotoxina pero permiten que los antígenos de *Bordetella* fluyan a través o sino se separen de la endotoxina.

25 Alternativamente, puede purificarse PT utilizando cromatografía con perlita, tal como se describe en la patente EP 336736, asignada al cesionario de la misma.

#### Desintoxicación del PT

30 El PT se desintoxica para eliminar las actividades no deseadas que podrían producir reacciones secundarias de la vacuna final. Puede utilizarse cualquiera de una variedad de procedimientos convencionales de desintoxicación química, tal como el tratamiento con formaldehído, peróxido de hidrógeno, tetranitro-metano o glutaraldehído.

35 Por ejemplo, puede desintoxicarse PT con glutaraldehído utilizando una modificación del procedimiento descrito por Muñoz *et al.* (ref. 57). En este procedimiento de desintoxicación PT purificado se incuba en una solución que contiene solución salina tamponada con fosfato 0,01 M. La solución se prepara al 0,05% con glutaraldehído y la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante dos horas, y a continuación se prepara 0,02 M con L-lisina. La mezcla se incuba más durante dos horas a temperatura ambiente y a continuación se dializa durante dos días frente a PBS 0,01 M. En una forma de realización específica, puede utilizarse el procedimiento de desintoxicación de la patente EP 336736. En resumen el PT puede desintoxicarse con glutaraldehído de la forma siguiente:

40 El PT purificado en fosfato potásico 75 mM a pH 8,0 que contiene cloruro sódico 0,22 M se diluye con un volumen igual de glicerol a concentraciones de proteína de aproximadamente 50 a 400 µg/ml. La solución se calienta a 37°C y se desintoxica por adición de glutaraldehído a una concentración final de 0,5% (p/v). La mezcla se mantiene a 37°C durante 4 h y a continuación se añade ácido aspártico (1,5 M) a una concentración final de 0,25 M. Se incuba la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se filtra a través de membranas con 10 volúmenes de fosfato potásico 10 mM a pH 8,0 que contiene cloruro sódico 0,15 M y glicerol al 5% para reducir el glicerol y eliminar el glutaraldehído. El toxoide PT se filtra estéril a través de una membrana de 0,2 µm.

50 Si se utilizan técnicas recombinantes para preparar la molécula mutante PT que no muestra ninguna o poca toxicidad, para su utilización como molécula toxoidada, la desintoxicación química no es necesaria.

#### Purificación de HAF

55 HAF puede purificarse en el sobrenadante del cultivo esencialmente tal como describe Cowell *et al.* (ref. 58). Los activadores de crecimiento, tal como las beta-ciclodextrinas metiladas, pueden utilizarse para aumentar el rendimiento de HAF en los sobrenadantes del cultivo. El sobrenadante del cultivo se aplica a una columna con hidroxipatita. HAF se absorbe en la columna, pero PT no. La columna se lava intensamente con Triton X-100 para eliminar la endotoxina. HAF se eluye a continuación utilizando NaCl 0,5 M en fosfato sódico 0,1 M y, si es necesario, se pasa a través de una columna Sepharose con fetuina para eliminar el PT residual. La purificación adicional puede implicar el paso a través de una columna Sepharose CL-6B.

60 Alternativamente, HAF puede purificarse utilizando anticuerpos monoclonales contra el antígeno, cuando los anticuerpos se fijan a una columna de afinidad activada por CNBr (ref. 59).

65 Alternativamente, HAF puede purificarse utilizando cromatografía con perlita tal como se describe en la patente EP 336736 mencionada anteriormente.

Purificación de la proteína de la membrana externa de 69 kDa (pertactina)

5 La proteína de la membrana externa de 69 kDa (69K o pertactina) puede recuperarse de las células bacterianas en primer lugar inactivando las células con un agente bacteriostático tal como timerosal, tal como se describe en la patente EP 484621 publicada e incorporada en la presente como referencia a la misma. Las células inactivadas se ponen en suspensión en un medio acuoso, tal como PBS (pH 7 a 8) y se somete a extracción repetida a temperatura elevada (45 a 60°C) con posterior enfriamiento a la temperatura ambiente o 4°C. Las extracciones liberan la proteína 69 K de las células. El material que contiene la proteína 69 K se recoge por precipitación y se pasa a través de una columna Affi-gel Blue. La proteína 69 K se eluye con una concentración alta de sal, tal como cloruro de magnesio 0,5 M. Después de la diálisis se pasa a través de un soporte de cromatofoque.

15 Alternativamente, la proteína de 69 kDa puede purificarse en el sobrenadante de un cultivo de *B. pertussis* tal como se describe en la solicitud de PCT WO 91/15505, en nombre del cesionario de la misma.

Otros procedimientos de purificación apropiados de la proteína de la membrana externa de 69 kDa de *B. pertussis* se describen en la patente US nº 5.276.142, concedida a Gotto *et al.*, el 4 de enero de 1984 y en la patente US nº 5.101.014, concedida a Burns el 31 de marzo de 1992.

20 Se realizaron numerosas pruebas clínicas en personas tal como se describe en la presente memoria para demostrar la seguridad, la no reactividad y la utilidad de las vacunas de componentes para la protección contra la tos ferina. En particular, se obtuvieron las respuestas inmunitarias a cada uno de los antígenos contenidos en las vacunas (como se muestra, por ejemplo, en la tabla 3 a continuación). Se analizó una vacuna CP<sub>10/5/5/3</sub>DT contra la tos ferina acelular específica en una prueba clínica doble al azar, larga, controlada con placebo, multicentro, en una población humana en situación de riesgo para estimar la eficacia de la vacuna contra la tosferínica típica.

La definición del caso para la enfermedad de tosferínica típica fue:

30 Veintiún días o más de tos espasmódica, y bien *B. pertussis* confirmada por cultivo, o pruebas serológicas de infección específica de *Bordetella* indicadas por un aumento de anticuerpo de IgG o IgA al 100% en ELISA frente a HAF o PT en sueros emparejados, o si se carece de datos serológicos, el niño del estudio ha estado en contacto con un caso de *B. pertussis* confirmado por el cultivo en casa con comienzo de tos 28 días antes o después del comienzo de la tos en el niño del estudio.

35 Los resultados de este estudio demostraron que CP<sub>10/5/5/3</sub>DT es aproximadamente 85% de eficaz en la prevención de la tos ferina tal como se define en la definición del caso para la enfermedad de tos ferina típica descrita anteriormente. En el mismo estudio, una vacuna acelular antitosferínica de dos componentes que contiene solamente PT y HAF fue aproximadamente 58% eficaz y una vacuna contra la tos ferina de células completas fue aproximadamente 48% eficaz (véase la tabla 4 a continuación). Además, la vacuna de CP<sub>10/5/5/3</sub>DT previno la tos ferina leve definida como una tos de por lo menos un día de duración a una eficacia de aproximadamente 77%. En particular, el perfil de la respuesta inmunitaria obtenido fue sustancialmente el mismo que el obtenido después de la inmunización con vacunas contra la tos ferina de células completas de las que se informa que son muy eficaces contra la tos ferina.

45 Preparación y utilización de la vacuna

50 Por lo tanto, las composiciones inmunógenas adecuadas para ser utilizadas como vacunas, pueden prepararse a partir de los inmunógenos de *Bordetella* tal como se da a conocer en la presente memoria. La vacuna provoca una respuesta inmunitaria en un paciente que produce anticuerpos que pueden ser opsonizantes o bactericidas. El paciente a ser sometido a la prueba de provocación debería vacunarse con *B. pertussis*, dichos anticuerpos se unen a las bacterias y las inactivan. Además, los anticuerpos opsonizantes o bactericidas pueden proporcionar también protección por mecanismos alternativos.

55 Las composiciones inmunógenas que incluyen vacunas pueden prepararse como inyectables, como soluciones líquidas o emulsiones. Los inmunógenos de *Bordetella* pueden mezclarse con excipientes farmacéuticamente aceptables que son compatibles con los inmunógenos. Dichos excipientes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. Las composiciones inmunógenas y las vacunas pueden contener además sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH o adyuvantes para aumentar la eficacia de las mismas. Las composiciones inmunógenas y las vacunas pueden administrarse por vía parenteral, por inyección subcutánea o intramuscular. Las preparaciones inmunógenas y las vacunas se administran de manera compatible con la formulación de la dosis, y en dicha cantidad serán terapéuticamente eficaces, inmunógenas y protectoras. La cantidad que debe administrarse depende del paciente que va a tratarse, incluyendo, por ejemplo, la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, y, si es necesario, para producir una respuesta inmunitaria mediada por células. Las cantidades exactas de ingrediente activo requeridas que deben administrarse dependen del criterio del médico de familia. Sin embargo, los intervalos de dosis adecuadas son determinados fácilmente 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 son también variables, pero pueden incluir una administración inicial seguida de administraciones sucesivas. La dosis puede depender también de la vía de administración y variará según el tamaño del hospedador.

5 La concentración de los inmunógenos en una composición inmunógena según la invención está comprendida en general entre aproximadamente 1 al 95%. Una vacuna que contiene material antigénico de solamente un patógeno es una vacuna monovalente. Las vacunas que contienen material antigénico de varios patógenos son las vacunas combinadas y también pertenecen a la presente invención. Dichas vacunas combinadas contienen, por ejemplo, material procedente de varios patógenos o de varias cepas del mismo patógeno, o procedente de combinaciones de  
10 varios patógenos.

La inmunogenicidad puede mejorarse significativamente si los antígenos se administran junto con adyuvantes, normalmente utilizados como solución del 0,005 al 0,5 por ciento en solución salina tamponada con fosfato. Los adyuvantes aumentan la inmunogenicidad de un antígeno pero ellos mismos no son necesariamente inmunógenos.  
15 Los adyuvantes pueden actuar reteniendo el antígeno localmente cerca del sitio de administración para producir un efecto prolongado que facilita una liberación lenta, mantenida del antígeno a las células del sistema inmunitario. Los adyuvantes pueden atraer también células del sistema inmunitario a un antígeno retardante y estimular dichas células para provocar respuestas inmunitarias.

20 Los agentes inmunoestimuladores o adyuvantes se han utilizado durante muchos años para mejorar las respuestas inmunitarias del hospedador, por ejemplo, a las vacunas. Los adyuvantes intrínsecos, tales como lipopolisacáridos, normalmente son los componentes de las bacterias destruidas o atenuadas utilizadas como vacunas. Los adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que por lo general no están unidos por enlace covalente a los antígenos y se formulan para aumentar las respuestas inmunitarias del hospedador. Por lo tanto, se han identificado  
25 adyuvantes que aumentan la respuesta inmunitaria a antígenos administrados vía parenteral. Algunos de estos adyuvantes son tóxicos, sin embargo, y pueden producir efectos secundarios indeseables, haciéndolos inadecuados para su utilización en seres humanos y muchos animales. De hecho, solamente el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio (denominado en conjunto normalmente alumbre) se utilizan de forma rutinaria como adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias. La eficacia de la alumbre para aumentar las respuestas del anticuerpo a los toxoides diftérico y tetánico está bien demostrada y, más recientemente, una vacuna HBsAg se ha mejorado con alumbre. Aunque la utilidad del alumbre está muy demostrada para algunas aplicaciones tiene limitaciones. Por ejemplo, el alumbre es ineficaz para la vacunación contra la gripe e inconstantemente provoca una respuesta inmunitaria mediada por células. Los anticuerpos producidos por antígenos mejorados con alumbre son principalmente del isotipo IgG1 en el ratón, lo que puede no ser óptimo para la protección por algunos agentes de  
30 vacuna.

Una amplia gama de adyuvantes extrínsecos puede provocar potentes respuestas inmunitarias a los antígenos. Éstas incluyen saponinas acomplejadas para antígenos de proteínas de la membrana (complejos inmunoestimulantes), polímeros plurónicos con aceite mineral, micobacterias destruidas en aceite mineral, adyuvante completo de Freund, productos bacterianos, tales como dipéptido de muramilo (DPM) y lipopolisacáridos (LPS), así como lípido A y liposomas.  
40

Para provocar de manera eficaz respuestas inmunitarias humores (RIH) e inmunidad mediada por células (IMC) los inmunógenos se emulsionan con frecuencia en adyuvantes. Muchos adyuvantes son tóxicos, produciendo granulomas, inflamaciones agudas y crónicas (adyuvante completo de Freund, ACF), citólisis (saponinas y polímeros plurónicos) y pirogenicidad, artritis y uveítis anterior (LPS y MDP). Aunque FCA es un excelente adyuvante y se utiliza ampliamente en investigación, no está permitida su utilización en vacunas humanas o veterinarias debido a su toxicidad.  
45

50 Las características deseables de los adyuvantes ideales incluyen:

- (1) falta de toxicidad;
- (2) capacidad para estimular una respuesta inmunitaria de larga duración;
- (3) sencillez de preparación y estabilidad en el almacenamiento de larga duración;
- 55 (4) capacidad para producir tanto ICM como RIH contra antígenos administrados por varias vías;
- (5) sinergia con otros adyuvantes;
- (6) capacidad de interactuar selectivamente con poblaciones de células presentadoras del antígeno (CPA);
- (7) capacidad para provocar específicamente respuestas inmunitarias apropiadas específicas de células de  $T_H1$  o  $T_H2$ ; y
- 60 (8) capacidad para aumentar selectivamente los niveles del isotipo del anticuerpo apropiado (por ejemplo, IgA) contra antígenos.

La patente US nº 4.855.283 concedida a Lockhoff *et al.*, el 8 de agosto de 1989 da a conocer análogos de glucolípido que incluyen N-glucosilamidas, N-glucosilureas y N-glucosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en el resto del azúcar por un aminoácido, como inmunomoduladores o adyuvantes. Por lo tanto, Lockhoff *et al.* (patente US nº 4.855.283 y ref. 60) publicaron que los análogos de N-glucolípido que presentan similitudes  
65

estructurales con los glucolípidos naturales, tales como los glucoesfingolípidos y glucoglicerolípidos, son capaces de provocar potentes respuestas inmunitarias tanto en la vacuna del virus del herpes simple como la vacuna del virus de la pseudorrabia. Algunos glucolípidos se han sintetizado a partir de alquilaminas de cadena larga y ácidos grasos que están unidos directamente con los azúcares por el átomo de carbono anomérico, para imitar las funciones de los restos de lípido naturales.

La patente US nº 4.258.029 concedida a Moloney, asignada al cesionario de la misma, da a conocer que el hidrocloreto de octadecil tirosina (OTH) funciona como adyuvante cuando se acompleja con el toxoide tetánico y la vacuna del virus de la poliomielitis tipo I, II y III de formalina. Además, Nixon-George *et al.* (ref. 61), describieron que los ésteres de octadecilo de los aminoácidos aromáticos acomplejados con un antígeno de superficie de la hepatitis B recombinante, aumentó las respuestas inmunitarias del hospedador contra el virus de la hepatitis B.

### Ejemplos

La descripción anterior describe generalmente la presente invención. Una comprensión más completa puede obtenerse haciendo referencia a los ejemplos específicos siguientes. Estos ejemplos se describen solamente a título de ilustración y no están orientadas a limitar el alcance de la invención. Los cambios en la forma y sustitución de los equivalentes se contemplan como circunstancias pueden sugerir o resultar conveniente. Aunque en la presente memoria se han utilizado expresiones específicas, dichas expresiones se proporcionan a título descriptivo y no limitativo.

Los procedimientos de la bioquímica de proteínas, la fermentación y la inmunología utilizados pero no descritos explícitamente en esta exposición y estos ejemplos, están ampliamente publicados en la bibliografía científica y están comprendidos dentro de la capacidad de los expertos en la materia.

#### Ejemplo 1

Este ejemplo describe la multiplicación de *Bordetella pertussis*.

Semilla patrón:

Cultivos de semilla patrón de una cepa de *Bordetella pertussis* se mantuvieron como lotes de semilla liofilizados, entre 2°C y 8°C.

Semilla de trabajo

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

Componente	Para 1 litro
Hidrolizado de caseína (tratado con carbón activo)	10,0 g
Ácido nicotínico	0,001 g
Cloruro cálcico	0,002 g
Cloruro sódico	5,0 g
Cloruro de magnesio hexahidratado	0,025 g
Cloruro potásico	0,200 g
Fosfato de potasio dibásico	0,250 g
Almidón	1,0 g
Agua destilada	hasta 1,0 litro

El pH se ajusta entre  $6,9 \pm 0,1$  con solución al 1% de carbonato sódico. El medio se distribuye en tubos y se esteriliza por vaporizado en el autoclave durante 20 minutos y esterilización en el autoclave durante 20 minutos entre 121°C y 124°C. La semilla se subcultivó dos veces, en primer lugar en placas BGA y a continuación en agar-agar con componente de tos ferina (CPA). El agar-agar con componente de tos ferina (CPA) tiene la siguiente composición:

NaCl	2,5 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g/l
KCl	0,2 g/l
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0,1 g/l
Tris base	1,5 g/l
Casaminoácidos	10,0 g/l
NaHglutamato	10,0 g/l
HCl conc.	hasta pH 7,2
Agar-agar	15,0 g/l
Factores de crecimiento (CPGF)	10,0 ml/l

Factores de crecimiento con componente de tos ferina (CPGF) - 100 x tienen la siguiente composición:

5	L-cisteína HCl	4,0 g/l
	Niacina	0,4 g/l
	Ácido ascórbico	40,0 g/l
	Glutatión, reducido	15,0 g/l
	Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·(H <sub>2</sub> O) <sub>7</sub>	1,0 g/l
10	Dimetil-β -ciclodextrina	100 g/l
	CaCl <sub>2</sub> ·(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	2,0 g/l

El cultivo final se puso en suspensión en tampón de suspensión de semilla de tos ferina (CPSB), se distribuyó en alícuotas de 2 a 4 ml y se almacenó congelado entre -60°C y -85°C. El tampón de suspensión de la semilla de tos ferina (PSSB) tiene la composición siguiente:

15	Casaminoácidos	10,0 g/l
	Tris base	1,5 g/l
	Glicerol anhidro	100 ml/l
20	HCl conc.	hasta pH 7,2

Estas suspensiones en glicerol proporcionaron el material de partida para la preparación de la semilla de operación.

#### Procedimiento de cultivo

25 La propagación de la semilla de trabajo se realizó en botellas Roux de agar-agar con componente de tos ferina durante 4 a 7 días entre 34°C y 38°C. Después de este cultivo, se lavaron las células con caldo de cultivo de componente de tos ferina (CPB). Se observó en las muestras mediante tinción de Gram, la pureza y opacidad del cultivo.

30 Las células se transfirieron a matraces cónicos de 4 litros que contenían CPB y se incubaron entre 34°C y 38°C durante 20 a 26 horas con agitación. Se observaron las muestras mediante tinción de Gram y se comprobó la pureza del cultivo. Los matraces se mezclaron y se utilizó la suspensión para sembrar dos fermentadores que contenían CPB (volumen de partida de 10 litros a D.O.<sub>600</sub> 0,1-0,4). La semilla se cultivó hasta D.O.<sub>600</sub> final de 5,0 a 10,0. En las muestras se analizó por tinción de Gram, la pureza del cultivo, por ELISA específicos para el antígeno y la esterilidad.

35

#### Ejemplo 2

40 Este ejemplo describe la purificación de antígenos a partir del cultivo de células de *Bordetella pertussis*.

40

#### Producción de caldo de cultivo y concentrados celulares

45 La suspensión bacteriana se cultivó en dos fermentadores de producción, entre 34°C y 37°C durante 35 a 50 horas. Se tomaron muestras en los fermentadores para pruebas de esterilidad del medio. La suspensión se alimentó a una centrifugadora de pila de discos de flujo continuo (12.000 x g) para separar las células del caldo de cultivo. Se recogieron las células para esperar la extracción del componente de fimbrias. El licor clarificado se pasó a través de un filtro de membrana de 0,22 μm. El licor filtrado se concentró por ultrafiltración utilizando una membrana con límite de peso molecular nominal (NMWL) de 10 a 30 kDa. El concentrado se almacenó para esperar la separación y purificación de la toxina de la tos ferina (PT), la hemoaglutinina filamentososa (HAF) y los componentes de 69 kDa (pertactina).

50

#### Separación de los componentes del caldo de cultivo

55 Los componentes del caldo de cultivo (69 kDa, PT y HAF) se separaron y purificaron por cromatografía en perlita y las etapas de elución selectiva, esencialmente tal como se describe en la patente EP 336736 y la solicitud PCT WO 91/15505 publicada por los solicitantes, descrita anteriormente. Las operaciones de purificación específica efectuadas se describen a continuación.

55

#### Toxina de tos ferina (PT)

60

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

65

La fracción PT procedente de la cromatografía de perlita se cargó en una columna de hidroxiapatita y a continuación se lavó con tampón de fosfato potásico 30 mM. Se eluyó el PT con tampón fosfato potásico 75 mM/NaCl 225 mM. La columna se lavó con fosfato de potasio 200 mM/NaCl 0,6 M para obtener la fracción de HAF que se descartó. Se

añadió glicerol al PT purificado hasta 50% y la mezcla se almacenó entre 2°C y 8°C hasta la desintoxicación en una semana.

#### Hemoaglutinina filamentosa (HAF)

5 La fracción HAF se eluyó de la columna de perlita con Tris 50 mM/NaCl 0,6 M. Se purificó la hemoaglutinina filamentosa por cromatografía sobre hidroxapatita. La fracción de HAF procedente de la columna de perlita se cargó en una columna con hidroxapatita y a continuación se lavó con fosfato potásico 30 mM que contenía Triton X-100 al 0,5%, seguido de tampón de fosfato potásico 30 mM. La fracción de PT se eluyó con tampón de fosfato potásico 85 mM y se descartó. La fracción de HAF se eluyó con fosfato potásico 200 mM/NaCl 0,6 M y se almacenó entre 2°C y 8°C hasta la desintoxicación en una semana.

#### 69 kDa (pertactina)

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

25 La proteína de la membrana externa de 69 kDa obtenida por precipitación en sulfato de amonio al 35% (p/v) del compuesto de ensayo en perlita tratado se utilizó para la purificación. Se añadió sulfato amónico (100 ± 5 g por litro) a la fracción de 69 kDa y se agitó la mezcla durante por lo menos 2 horas entre 2°C y 8°C. Se centrifugó la mezcla (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 entre 2°C y 8°C. Se centrifugó la mezcla (7.000 x g) para recuperar el sedimento, que se disolvió en Tris 10 mM, HCl, pH 8. La fuerza iónica de la solución se ajustó a la equivalente de Tris HCl 10 mM (pH 8), que contenía sulfato amónico 15 mM.

30 Se aplicó la proteína de 69 kDa a la columna de hidroxapatita conectada en tándem con una columna de Q-Sepharose. Se recogió la proteína de 69 kDa en el compuesto de ensayo, se calentó a reflujo en las columnas con Tris 10 mM, HCl (pH 8), que contenía sulfato amónico 15 mM y se mezcló con la proteína de 69 kDa en el compuesto de ensayo. La proteína de 69 kDa se filtró por diálisis con 6 a 10 volúmenes de fosfato potásico 10 mM (pH 8) que contenía NaCl 0,15 M en una membrana NMWL de 100 a 300 kDa. El ultrafiltrado se recogió y la proteína de 69 kDa en el ultrafiltrado concentrado.

35 La proteína de 69 kDa se intercambié el disolvente en Tris HCl 10 mM (pH 8) y se adsorbió en Q-Sepharose, se lavó con Tris HCl 10 mM (pH 8/sulfato de amonio 5 mM). La proteína de 69 kDa se eluyó con fosfato potásico 50 mM (pH 8). La proteína de 69 kDa se filtró por diálisis con 6 a 10 volúmenes de fosfato de potasio 10 mM (pH 8) que contenía NaCl 0,15 M en una membrana NMWL de 10 a 30 kDa. La proteína de 69 kDa se filtró estéril a través de un filtro ≤ 0,22 µm. La masa estéril se almacenó entre 2°C y 8°C y se realizó la adsorción en tres meses.

#### Aglutinógenos fimbriales

45 Se purificaron los aglutinógenos de la pasta celular después de la separación del caldo de cultivo. La pasta celular se diluyó hasta una fracción de 0,05 volúmenes de células en un tampón que contenía fosfato potásico 10 mM, NaCl 150 mM y urea 4 M, y se mezcló durante 30 minutos. El lisado celular se clarificó por centrifugación (12.000 x g), a continuación se concentró y se filtró por diálisis frente a fosfato potásico 10 mM/NaCl 150 mM/Triton X-100 al 0,1% utilizando un filtro de membrana NMWL de 100 a 300 kDa.

50 Se calentó el concentrado a 80°C durante 30 min y a continuación se volvió a clarificar por centrifugación (9.000 x g). Se añadió PEG 8000 al sobrenadante clarificado hasta una concentración final de 4,5% ± 0,2% y se agitó suavemente durante un mínimo de 30 minutos. El precipitado resultante se recogió por centrifugación (17.000 x g) y el sedimento se extrajo con fosfato de potasio 10 mM/tampón NaCl 150 mM para proporcionar una solución de aglutinógeno fimbrial en bruto. Los aglutinógenos fimbriales se purificaron por paso sobre sílice PEI. La solución en bruto se preparó con 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.

60 El compuesto de ensayo de las columnas se concentró y se filtró por diálisis frente a tampón fosfato de potasio 10 mM/NaCl 150 mM utilizando filtro de membrana NMWL de 100 a 300 kDa. La masa estéril se almacena entre 2°C y 8°C y se lleva a cabo la adsorción en tres meses. La preparación del aglutinógeno fimbrial contenía Agg 2 fimbrial y Agg 3 fimbrial en una relación en peso de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2:1 y se observó que estaba sustancialmente exento de Agg 1.

**Ejemplo 3**

Este ejemplo describe la toxoidación de los antígenos purificados de *Bordetella pertussis*, PT y HAF.

El PT, preparado en forma pura como se describe en el Ejemplo 2 se convirtió en vacuna ajustando la concentración de glutaraldehído en la solución de PT a  $0,5\% \pm 0,1\%$  e incubando a  $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas. Se interrumpió la reacción añadiendo L-aspartato  $0,21 \pm 0,02$  M. La mezcla se mantuvo a continuación a temperatura ambiente durante  $1 \pm 0,1$  horas y a continuación entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$  durante 1 a 7 días.

La mezcla resultante se filtró por diálisis frente a tampón de fosfato potásico 10 mM/NaCl 0,15 M/glicerol al 5% en un filtro de membrana NMWL de 30 kDa y a continuación se esterilizó por paso a través de un filtro de membrana  $\leq 0,22$   $\mu\text{m}$ . La masa estéril se almacenó entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$  y se realizó la adsorción en tres meses.

La fracción de HAF, preparada en forma pura como se describe en el Ejemplo 2 se convirtió en vacuna ajustando la concentración de de L-lisina y formaldehído a  $47 \pm 5$  mM y  $0,24 \pm 0,5\%$  respectivamente e incubando de  $35^{\circ}\text{C}$  a  $38^{\circ}\text{C}$  durante 6 semanas. La mezcla se filtró atd membrana frente a fosfato potásico 10 mM/NaCl 0,5 M utilizando un filtro de membrana NMWL de 30 kDa y se esterilizó por paso a través de un filtro de membrana. La masa estéril se almacenó entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$  y se realizó la adsorción en tres meses.

**Ejemplo 4**

Este ejemplo describe la adsorción de los antígenos purificados de *Bordetella pertussis*.

Para la adsorción individual de PT, HAF, Agg y 69 kDa en 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 alguno de los antígenos distribuidos asépticamente en el recipiente. Se añadió asépticamente 2-fenoxietanol hasta proporcionar una concentración final de  $0,6\% \pm 0,1\%$  v/v y se agitó hasta ser homogénea. El volumen apropiado de fosfato de aluminio se añadió asépticamente al recipiente. Se añadió un volumen apropiado de agua destilada esterilizada para llevar la concentración final hasta 3 mg de fosfato de aluminio/ml. Se sellaron los recipientes y se marcaron y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 4 días. El recipiente se almacenó a continuación esperando la formulación final.

**Ejemplo 5**

Este ejemplo describe la formulación de un componente de la vacuna contra la tos ferina combinado con los toxoides diftéricos y tetánicos.

Los antígenos de *B. pertussis* preparados como se describe en los ejemplos anteriores se formularon con toxoides diftéricos y tetánicos para proporcionar varios vacunas contra la tos ferina del componente (CP).

Se produjeron componentes de la tos ferina a partir del cultivo de *Bordetella pertussis* en un cultivo sumergido tal como se describe con detalle en los Ejemplos 1 a 4 anteriores. Una vez terminado el cultivo, el caldo de cultivo y las células bacterianas se separaron por centrifugación. Cada antígeno se separó individualmente. La toxina de la tos ferina (PT) y hemoaglutinina filamentosa (HAF) se purificaron en el caldo de cultivo por cromatografía secuencial sobre perlita e hidroxapatita. Se desintoxicó PT con glutaraldehído y algún PT residual (aproximadamente 1%) presente en la fracción HAF se desintoxicó con formaldehído. Se prepararon aglutinógenos fimbriales (2 + 3) (AGG) a partir de las células bacterianas. Se destruyeron las células con urea y se calentaron, y los aglutinógenos fimbriales se purificaron por precipitación con polietilenglicol y cromatografía sobre polietilenimina sílice. El componente de la proteína de 69 kDa (pertactina) se aisló en el ensayo precedente de la etapa de cromatografía sobre perlita (Ejemplo 2) por precipitación con sulfato de amonio y se purificó por cromatografía secuencial sobre hidroxapatita y Q-sepharose. Todos los componentes se esterizaron por filtración a través de un filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Se preparó toxoide diftérico procedente del cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* en cultivo sumergido por los procedimientos habituales. La producción del toxoide diftérico se divide en cinco etapas, a saber mantenimiento de la semilla de trabajo, cultivo de *Corynebacterium diphtheriae*, recolección de la toxina de la difteria, desintoxicación de la toxina de la difteria y concentración del toxoide de la difteria.

Preparación del toxoide diftérico

(I) Semilla de trabajo

La cepa de *Corynebacterium diphtheriae* se mantuvo como un lote de semillas liofilizadas. La semilla reconstituida se cultivó en tubos en pendiente con medio de Loeffler durante 18 a 24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y a continuación se

transfirió a matraces de medio de difteria. En el cultivo se analizó a continuación la pureza y el contenido en Lf. La semilla restante se utilizó para inocular un fermentador.

5 (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, cloruro cálcico y fosfato. Las cantidades existentes de cada solución (fosfato, sulfato ferroso, cloruro cálcico) se determinaron experimentalmente para cada lote del medio. Las concentraciones seleccionadas son aquellas que proporcionan el contenido más alto de Lf. Al final del ciclo de cultivo (30 a 50 horas) se tomaron muestras de los cultivos para pureza y contenido de Lf.

Se ajustó el pH con bicarbonato sódico, y se inactivó el cultivo 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 realizó un ensayo de esterilidad para confirmar la ausencia de *C. diphtheriae* viva.

15 (III) Recolección de toxina de la difteria

Los cultivos tratados con tolueno de uno o varios fermentadores se mezclaron en un depósito grande. Se añadieron aproximadamente 0,12% de bicarbonato sódico, 0,25% de carbón activo y 23% de sulfato amónico y se midió el pH.

Se agitó la mezcla durante aproximadamente 30 minutos. Se añadió tierra de diatomeas y se bombeó la mezcla a un filtro de profundidad. Se recirculó el filtrado hasta quedar transparente, se recogió a continuación y se tomaron muestras para ensayo de contenido de Lf. Se añadió sulfato amónico adicional al filtrado para dar una concentración del 40%. Se añadió también tierra de diatomeas. La mezcla se mantuvo durante 3 a 4 días entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$  para dejar sedimentar el precipitado. Se recolectó la toxina precipitada y se disolvió en solución salina al 0,9%. Se eliminó la tierra de diatomeas por filtración y la toxina se dializó frente a solución salina al 0,9%, para eliminar el sulfato amónico. Se mezcló la toxina dializada y se tomaron muestras para el ensayo de contenido en Lf y pureza.

30 (IV) Desintoxicación de la toxina de la difteria

La desintoxicación tuvo lugar inmediatamente después de la diálisis. Para la desintoxicación, se diluyó la toxina de modo que la solución final contenía:

- 35 (a) Toxina de la difteria a  $1.000 \pm 10\%$  Lf/ml.  
 (b) Bicarbonato sódico al 0,5%  
 (c) Formalina al 0,5%  
 (d) Monohidrócloruro de L-lisina al 0,9% p/v

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

Se filtró el toxoide a través de un filtro de tierra de diatomeas con celulosa y/o un prefiltro de membrana y un filtro de membrana de  $0,2 \mu\text{m}$  en el recipiente de recogida y se incubó durante 5 a 7 semanas a  $34^{\circ}\text{C}$ . Se retiró una muestra para ensayo de toxicidad.

45 (V) Concentración del toxoide purificado

Se mezclaron los toxoides, a continuación se concentraron por ultrafiltración y se recogieron en un recipiente adecuado. Se tomaron muestras para ensayo de contenido en Lf y pureza. Se añadió el conservante (2-fenoxietanol) para dar una concentración final de 0,375% y se ajustó el pH entre 6,6 y 7,6.

Se esterilizó el toxoide por filtración a través de un prefiltro y un filtro de membrana de  $0,2 \mu\text{m}$  (o equivalente) y se recolectó. Se tomaron muestras a continuación del toxoide estéril para la irreversibilidad del contenido en Lf del toxoide, el contenido de conservante, pureza (contenido en nitrógeno), ensayos de esterilidad y toxicidad. El toxoide concentrado estéril se almacenó entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$  hasta la formulación final.

55 Preparación del toxoide tetánico

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

60 La producción del toxoide tetánico puede dividirse en cinco etapas a saber, mantenimiento de la semilla de trabajo, cultivo de *Clostridium tetani*, recogida de toxina del tétanos, desintoxicación de la toxina del tétanos y purificación del toxoide tetánico.

65 (I) Semilla de trabajo

La cepa de *Clostridium tetani* utilizada en la producción de la toxina del tétanos para la conversión al toxoide tetánico

se mantuvo en forma liofilizada en un lote de semillas. La semilla se inoculó en medio con tioglicolato y se dejó desarrollar durante aproximadamente 24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Se tomó una muestra para el ensayo de pureza del cultivo.

5 (II) Cultivo de *Clostridium tetani*

El medio de tétanos se distribuyó en un fermentador, se calentó y se enfrió. El fermentador se sembró a continuación y se dejó desarrollar el cultivo durante 4 a 9 días a  $34^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Se tomó una muestra para la pureza del cultivo y ensayo del contenido en Lf.

10

(III) Recolección de toxina del tétanos

La toxina se separó por filtración a través de almohadillas de tierra de diatomeas con celulosa y la toxina clarificada a continuación se esterilizó en filtro utilizando filtros de membrana. Se tomaron muestras para el contenido en Lf y esterilidad. La toxina se concentró por ultrafiltración, utilizando un tamaño de poro de 30.000 daltons.

15

(IV) Desintoxicación de la toxina del tétanos

Se tomaron muestras de la toxina para el ensayo de contenido en Lf para desintoxicación. Se desintoxicó la toxina concentrada (475 a 525 Lf/ml) 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 a volumen con solución salina. El pH se ajustó a  $7,5 \pm 0,1$  y la mezcla se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 20 a 30 días. Se tomaron muestras para ensayo de esterilidad y toxicidad.

20

(V) Purificación del toxoide

25

El toxoide concentrado se esterilizó a través de prefiltrados, seguido de filtro de membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ . Se tomaron muestras para ensayos de esterilidad y contenido en Lf.

30

La concentración óptima de sulfato amónico se basó en un fraccionamiento. Se determinó la curva "S" de las muestras del toxoide. La primera concentración se añadió al toxoide (diluida entre 1.900 y 2.100 Lf/ml). La mezcla se mantuvo durante por lo menos 1 hora entre  $20^{\circ}\text{C}$  y  $25^{\circ}\text{C}$  y se recogió el sobrenadante y se descartó el precipitado que contenía la fracción de alto peso molecular.

35

Se añadió una segunda concentración de sulfato amónico al sobrenadante para el segundo fraccionamiento para eliminar las impurezas de bajo peso molecular. La mezcla se mantuvo durante al menos 2 horas entre  $20^{\circ}\text{C}$  y  $25^{\circ}\text{C}$  y a continuación pudo mantenerse entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$  durante un máximo de tres días. El precipitado que representa el toxoide purificado, se recolectó por centrifugación y filtración.

40

Se eliminó el sulfato amónico de la vacuna purificada por filtración por diálisis, utilizando membranas de ultrafiltración Amicon (o equivalentes) con PBS hasta que no pudo detectarse más sulfato amónico en la solución de la vacuna. Se ajustó el pH entre 6,6 y 7,6, y se añadió 2-fenoxietanol hasta dar una concentración final de 0,375%. Se esterilizó la vacuna por filtración en membrana, y se tomaron muestras para ensayo (irreversibilidad de la vacuna, contenido en Lf, pH, contenido en conservante, pureza, esterilidad y toxicidad).

45

Una formulación de una vacuna contra la tos ferina de componente combinada con toxoides diftérico y tetánico se denominó CP<sub>10/5/5/3</sub>DT. Cada dosis humana de 0,5 ml de CP<sub>10/5/5/3</sub>DT se formuló para contener:

- 10  $\mu\text{g}$  Toxoide de la tos ferina (PT)
- 5  $\mu\text{g}$  Hemoaglutinina filamentosa (HAF)
- 50 5  $\mu\text{g}$  Aglutinógenos 2 y 3 fimbriales (FIMB)
- 3  $\mu\text{g}$  Proteína de la membrana externa de 69 kDa
- 15 Lf Toxoide diftérico
- 5 Lf Toxoide tetánico
- 1,5 mg Fosfato de aluminio
- 55 0,6% 2-fenoxietanol, como conservante

Otra formulación de la vacuna contra la tos ferina de componente combinada con toxoides diftérico y tetánico se denominó CP<sub>10/5/5</sub>DT. Cada 0,5 ml de dosis humana de CP<sub>10/5/5</sub>DT se formuló para que contenga:

- 60 10  $\mu\text{g}$  Toxoide de la tos ferina (PT)
- 5  $\mu\text{g}$  Hemoaglutinina filamentosa (HAF)
- 5  $\mu\text{g}$  Aglutinógenos 2 y 3 fimbriales (FIMB)
- 15 Lf Toxoide diftérico
- 5 Lf Toxoide tetánico
- 65 1,5 mg Fosfato de aluminio
- 0,6% 2-fenoxietanol, como conservante

Otra formulación de la vacuna contra la tos ferina de componente combinada con toxoides diftéricos y tetánicos se denominó CP<sub>20/20/5/3</sub>DT. Cada 0,5 ml de dosis humana de CP<sub>20/20/5/3</sub>DT se formuló para que contenga:

- 5 20 µg Toxoide de la tos ferina (PT)
- 20 µg Hemoaglutinina filamentosa (HAF)
- 5 µg Aglutinógenos fimbriales 2 y 3 (FIMB)
- 3 µg Proteína de la membrana externa de 69 kDa
- 15 Lf Toxoide diftérico
- 10 5 Lf Toxoide tetánico
- 1,5 mg Fosfato de aluminio
- 0,6% 2-fenoxietanol, como conservante

Otra formulación de la vacuna contra la tos ferina de componente combinada con toxoides diftéricos y tetánicos se denominó CP<sub>20/10/10/6</sub>DT. Cada 0,5 ml de dosis humana de CP<sub>20/10/10/6</sub>DT se formuló para que contenga:

- 20 µg Toxoide de la tos ferina (PT)
- 10 µg Hemoaglutinina filamentosa (HAF)
- 10 µg Aglutinógenos 2 y 3 fimbriales (FIMB)
- 20 6 µg Proteína de la membrana externa de 69 kDa
- 15 Lf Toxoide diftérico
- 5 Lf Toxoide tetánico
- 1,5 mg Fosfato de aluminio
- 0,6% 2-fenoxietanol, como conservante

25

### Ejemplo 6

Este ejemplo describe la evaluación clínica de vacunas contra la tos ferina de componente acelular, producidas según la invención.

30

#### (a) Estudios en adultos

Los estudios en adultos y niños de 16 a 20 meses de edad indicaban que las vacunas multicomponentes que contenían aglutinógenos fimbriales son seguras e inmunógenas (Tabla 2).

35

Se realizó un estudio clínico en Fase I en niños de 17 y 18 meses de edad en Calgary, Alberta con la vacuna contra la tos ferina de cinco componentes (CP<sub>10/5/5/3</sub>DT) y la reacción adversa indicada. Treinta y tres niños recibieron la vacuna y además 35 recibieron la misma vacuna sin el componente de la proteína de 69 kDa.

40

Las reacciones locales son raras. Las reacciones generalizadas desfavorables, que consisten principalmente en irritabilidad estaban presentes en aproximadamente la mitad de los participantes en el estudio, independientemente de la vacuna que se administró. Se midieron aumentos de anticuerpos significativos para aglutinógenos anti-PT, anti-FHA y antifimbriales y anticuerpos de IgG anti-69 kDa por inmunoanálisis enzimático y anticuerpos anti-PT en el ensayo de neutralización de células CHO. No se detectaron diferencias en la respuesta al anticuerpo de los niños que recibieron los cuatro componentes (CP<sub>10/5/5</sub>DT) o cinco componentes (CP<sub>10/5/5/3</sub>DT) excepto en el anticuerpo anti-69 kDa. Los niños que recibieron la vacuna de cinco componentes que contenía la proteína de 69 kDa presentaban un nivel de anticuerpos anti-69 kDa después de la inmunización significativamente mayor.

45

Se realizó un estudio de respuesta a la dosis con la vacuna de 4 componentes en Winnipeg, Manitoba, Canadá. Se utilizaron formulaciones de vacuna de dos componentes: CP<sub>10/5/5/3</sub>DT y CP<sub>20/10/10/6</sub>DT. Se incluyó también como referencia una vacuna de DPT de células completas.

50

Este estudio fue un estudio doble a ciegas en 91 lactantes de 17 a 18 meses de edad al tiempo de dosis de refuerzo contra la tos ferina. Tanto CP<sub>10/5/5/3</sub>DT como CP<sub>20/10/10/6</sub>DT fueron bien tolerados por estos niños. No se demostraron diferencias en el número de niños que presentaba reacción local, o reacciones generalizadas después de ambas vacunas del componente. En comparación, significativamente más niños que recibieron la vacuna de células completas presentaban reacciones locales y generalizadas que aquellos que recibieron las vacunas del componente CP<sub>20/10/10/6</sub>DT.

55

#### 60 Estudios en niños

##### Fase II

Se realizó un estudio utilizando la vacuna de CP<sub>10/5/5/3</sub>DT en Calgary, Alberta y British Columbia, Canada. En este estudio, 432 lactantes recibieron la vacuna contra la tos ferina del componente o la vacuna DPT de referencia de células completas a los 2, 4 y 6 meses de edad. La vacuna de CP<sub>10/5/5/3</sub>DT fue bien tolerada por estos lactantes. Las

65

reacciones locales fueron menos frecuentes con la vacuna del componente que con la vacuna de células completas después de cada dosis.

5 Una respuesta al anticuerpo significativa para todos los antígenos se demostró después de la vacunación con la  
vacuna contra la tos ferina del componente. Los receptores de la vacuna de células completa tuvieron una respuesta  
vigorosa al anticuerpo contra los aglutinógenos fimbriales, D y T. A los siete meses, del 82% al 89% de los  
receptores de la vacuna del componente y el 92% de los receptores de la vacuna de las células completas  
presentaba un incremento de cuatro veces o aumento mayor en el valor de anticuerpo para los aglutinógenos  
10 fimbriales. En comparación, la respuesta del anticuerpo contra FHA fue del 75% al 78% en las vacunas del  
componente en comparación con el 31% de los receptores de células completas. Se observó un aumento de cuatro  
veces en el anticuerpo anti-69 kDa en el 90% al 93% de los receptores de la vacuna del componente y el 75% de los  
de las células totales. Un aumento de cuatro veces en el anticuerpo contra PT por inmunoanálisis enzimático se  
observó en el 40% al 49% de las vacunas del componente y el 32% de las vacunas de células completas; un  
15 aumento de cuatro veces en el anticuerpo PT por neutralización de CHO se observó en el 55% al 69% de las  
vacunas del componente y el 6% de las vacunas de células completas (Tabla 2).

#### Fase II B

20 Se evaluaron las vacunas de CP<sub>20/20/5/3</sub>DT y de CP<sub>10/10/5/3</sub>DT en un estudio a ciegas al azar frente a una referencia de  
D<sub>15</sub>PT con un contenido en difteria de 15 Lf menor en comparación con una formulación de 25 Lf de 100 lactantes a  
los 2, 4 y 6 meses de edad. No se detectaron diferencias en las cantidades de reacciones adversas entre las  
formulaciones de dos componentes; ambas eran significativamente menos reactógenas que la referencia de células  
completas. Los valores de anticuerpo mayores frente a PT por inmunoanálisis enzimática y neutralización de CHO y  
25 FHA se consiguieron en los receptores de la vacuna con CP<sub>20/20/5/3</sub>DT con un contenido aumentado en antígenos. A  
los 7 meses, el valor de la media geométrica de anti-FHA fue de 95,0 en los receptores de CP<sub>20/20/5/3</sub>DT, 45,2 en los  
receptores de CP<sub>10/15/5/3</sub>DT y fueron solamente de 8,9 en los receptores de D<sub>15</sub>PT. Los valores anti-PT fueron de  
133,3, 58,4 y 10,4 por inmunoanálisis y de 82,4, 32,7 y 4,0 por neutralización de CHO respectivamente (Tabla 2).

30 El estudio demostró que la vacuna contra la tos ferina del componente combinada con los toxoides diftérico y  
tetánico adsorbidos, con un contenido aumentado del antígeno, era segura e inmunógena en lactantes y que el  
contenido en antígeno aumentado, aumentó la respuesta unitaria a los antígenos (PT y FHA) preparados sin  
aumento en reactogenicidad.

#### Ensayo comparativo en Fase II, NIAID, USA.

35 Se realizó un estudio en fase II en USA bajo los auspicios del National Institute of Allergy and Infectious Diseases  
(NIAID) como prelude a una prueba de eficacia a gran escala de las vacunas contra la tos ferina acelulares. Una  
vacuna contra la tos ferina de un componente de la invención en combinación con los toxoides diftérico y tetánico  
adsorbió (CP<sub>10/15/5/3</sub>DT) y se incluyó en esta prueba junto con otras 12 vacunas acelulares y 2 vacunas de células  
40 completas. Los resultados de seguridad se publicaron sobre 137 niños inmunizados a los 2, 4 y 6 meses de edad  
con la vacuna del componente CP<sub>10/15/5/3</sub>DT.

45 Como se aprecia en los estudios anteriores, la vacuna del componente se observó que era segura, de baja  
reactogenicidad y que era bien tolerada por las vacunas.

A los 7 meses, el anticuerpo anti-PT, el anticuerpo anti-FHA y el anticuerpo anti-69 kDa y el anticuerpo con  
aglutinógenos antifimbriales eran todos mayores o equivalentes a las concentraciones conseguidas después de las  
vacunas con células completas (ref. 71 y Tabla 2). Se realizó un estudio doble a ciegas en el que los niños fueron  
situados al azar para recibir bien la formulación de vacuna CP<sub>20/20/5/3</sub>DT o la CP<sub>10/15/5/3</sub>DT. Se inscribieron un total de  
50 2.050 lactantes en USA y Canadá; 1961 lactantes completaron el estudio. Ambas formulaciones de la vacuna eran  
seguras, de baja reactogenicidad e inmunógenas en estos lactantes. Se evaluó la inmunogenicidad en un subgrupo  
de 292. Se produjo un aumento de anticuerpo en todos los antígenos contenidos en la vacuna por ambas  
formulaciones de la vacuna. La formulación de CP<sub>20/20/5/3</sub>DT produjo valores mayores de anticuerpo contra FHA pero  
no contra PT. La formulación CP<sub>10/15/5/3</sub>DT produjo valores mayores contra el aglutinógeno de las fimbrias y los  
55 valores de aglutinógeno mayores.

Una seguridad adicional y un estudio de inmunogenicidad se realizaron en Francia. El diseño del estudio fue similar  
al estudio de Norteamérica, descrito anteriormente, excepto que se administraron vacunas a los 2, 3 y 4 meses de  
edad. Las reacciones locales y generalizadas fueron generalmente menores. En general la vacuna fue mejor  
60 aceptada por los participantes en el estudio francés utilizando este régimen de administración.

Prueba de eficacia controlada con placebo de dos vacunas antitosoferínicas acelulares y de una vacuna de células  
completas en 10.000 lactantes

65 Siguiendo los resultados de la prueba comparativa de USA en fase II NIAID, se seleccionaron vacunas acelulares de  
dos componentes y de cinco componentes para una prueba de eficacia multicentro, controlada por placebo doble al

5 azar. La prueba clínica se realizó en Suecia, donde existe una alta incidencia de tos ferina. La vacuna de dos componentes contenía gliceraldehído y PT inactivada por fomalina (25 µg), FHA tratado con formalina (25 µg) y 17 Lf del toxoide diftérico y 10 Lf del toxoide tetánico. La vacuna contra la tos ferina de cinco componentes fue CP<sub>10/5/5/3</sub>DT. Para la prueba, diez mil lactantes, que representan, aproximadamente la mitad de los lactantes de este grupo de edad en Suecia, se inscribieron en 14 lugares del estudio definidos geográficamente mediante la utilización de la partida de nacimiento.

10 Los niños nacidos en enero y febrero de 1992 se seleccionaron al azar en una prueba de 3 ramas. Después del consentimiento paterno, dos tercios de los lactantes recibieron una de cada dos preparaciones antitosferínicas acelulares contra la difteria y el tétanos a los dos, cuatro y seis meses de edad. El grupo de referencia recibió solamente DT. En mayo de 1992, se introdujo una vacuna DTP de células completas comercializada autorizada en USA y los niños nacidos en marzo hasta diciembre de 1992 se sometieron al azar en una prueba de 4 ramas. Después del consentimiento paterno, las tres cuartas partes de los lactantes recibieron una de cada tres preparaciones de DPT a los dos, cuatro y seis meses de edad. El grupo de referencia recibió solamente DT.

15 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. Se administraron dosis posteriores con intervalo de 8 semanas. Las vacunas se administraron por inyección intramuscular.

20 Se realizó un seguimiento durante 30 meses a los niños y a sus grupos familiares. Si había indicios de tos ferina, se recogían los datos clínicos y la verificación en el laboratorio se investigaba mediante aspiraciones nasales para cultivo bacteriológico y diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Se recogieron las muestras de sangre de enfermos en fases aguda y convaleciente para el diagnóstico serológico.

25 Antes de este estudio, se desconocía el alcance de la protección proporcionada por vacunas contra la tos ferina de un componente de la presente invención en una población humana en situación de riesgo (particularmente recién nacidos). En particular, la contribución de varios componentes de *Bordetella* y su presencia en las vacunas contra la tos ferina en cantidades relativas seleccionadas para la eficacia de las vacunas resultaba desconocida.

30 El principal objetivo de la prueba consistió en estimar la capacidad de las vacunas contra la tos ferina acelulares y de la vacuna de células completas para proteger contra la tos ferina típica en comparación con el placebo.

35 Un punto final secundario consistió en explorar la eficacia de la vacuna contra la infección de la tos ferina confirmada de gravedad variable.

La eficacia de la vacuna se define como el tanto por ciento de reducción en la probabilidad de contraer tos ferina entre receptores de la vacuna en relación con los niños sin vacunar.

40 El riesgo relativo de tos ferina en dos grupos de vacuna se expresa como la relación de la probabilidad de la enfermedad en los dos grupos.

45 La probabilidad de contraer tos ferina, denominada también la frecuencia del ataque, puede estimarse de diferentes maneras. En los cálculos del tamaño de la muestra, la probabilidad de contraer tos ferina en un grupo de estudio dado se estima por el cociente entre el número de niños con tos ferina y los niños que permanecen en el grupo de estudio a la terminación del seguimiento del estudio.

50 La eficacia del componente CP<sub>10/5/5/3</sub>DT de la vacuna en esta prueba para prevenir la tos ferina típica se representa en la Tabla 4 y fue de aproximadamente 85%. En la misma prueba una vacuna acelular de tos ferina de dos componentes que contenía solamente TP y FAH fue aproximadamente 58% eficaz y una vacuna de células completas fue solamente 48% eficaz. La CP<sub>10/5/5/3</sub>DT fue también eficaz para prevenir la tos ferina leve en una eficacia estimada de aproximadamente el 77%.

Las preparaciones de vacunas son seguras, no reactógenas, inmunógenas y protectoras en los seres humanos.

Tabla 1. Vacunas contra la tos ferina acelulares

Vacuna	PT	Agente toxoideo	HAF	P.69	AGG2	AGG3	Referencia
AMVC	+	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	-	-	-	-	62
Masa PHL <sup>d</sup>	+	TMN <sup>c</sup>	-	-	-	-	63
Instituto Merieux	+	GI <sup>d</sup>	+	-	-	-	64
Smith-Kline	+	FI <sup>e</sup> /GI	+	-	-	-	32
	+	FI/GI	+	+	-	-	32
CAMR <sup>f</sup>	+	FI	+	-	+	+	65
Lederle/Fakeda	+	FI	+	+	+	-	66
Connaught	+	GI	+	-	+	+	32
	+	GI	+	+	+	+	67

<sup>a</sup> Peróxido de hidrógeno inactivado. <sup>b</sup> Massachusetts Public Health Laboratories. <sup>c</sup> TMN, tetranitrometano inactivado. <sup>d</sup> GI, glutaraldehído inactivado. <sup>e</sup> FI, formalina inactivada. <sup>f</sup> Centro de Microbiología Aplicada e Investigación.

Tabla 2

Respuestas del anticuerpo de IgG al antígeno de la tos ferina y a los toxoides diftérico y tetánico en adultos y niños después de (inmunización con placebo o toxoides de la tos ferina acelular (AP), difteria-tétanos-tos ferina (DTP) o multicomponente acelular DTP (ADTP))

	Adultos			Niños				
	Antes de la inmunización Placebo	AP CP <sub>10/10/5/3</sub>	Después de la inmunización Placebo	AP CP <sub>10/10/5/3</sub>	Antes de la inmunización DTP	ADTP CP <sub>10/10/5/3</sub> DT	Después de la inmunización DTP	ADTP CP <sub>10/10/5/3</sub> DT
Toxoides de la tos ferina	16,45 (9,46-28,62)	22,78 (12,11-42,86)	16,56 (9,0-30,22)	415,87 (243,91-709,09)	43,71 (14,29-133,88)	15,45 (8,30-28,10)	221,32 (99,0,490,67)	306,55 (155,84,-603,03)
Hemoaglutinina filamentosa	15,24 (10,28-22,60)	23,59 (13,39-33,69)	13,36 (7,71-23,16)	317,37 (243,03-141,41)	2,93 (1,81-4,73)	3,86 (3,03-4,93)	30,06 (11,82-76,46)	29,86 (16,31-53,99)
Aglutinógeno	21,26 (12,10,37,23)	28,64 (12,20-67,21)	27,0 (15,37-47,78)	2048,00 (1025,62-4089,55)	26,72 (16,94-42,15)	29,24 (13,63-62,75)	315,2 (127,4-779,9)	1243,3 (594,8,2603,3)
Pertactina	7,89 (4,00-13,56)	11,47 (6,41-20,55)	7,46 (3,51-15,87)	855,13 (396,41-1844,67)	6,54 (2,79-15,33)	9,45 (5,50-16,23)	60,13 (24,59-147,04)	116,16 (57,97-233,19)
Ensayo de neutralización de células de CHO	12,30 (6,97,21,68)	21,11 (10,33-43,06)	10,78 (5,54-20,97)	604,67 (403,82-405,41),	27,47 (7,36-102,62)	9,71 (4,71,20,03)	270,60 (24,6-1100,8)	342,51 (146,6-800,2)
Toxoides diftérico	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	8,75 (6,52-23,92)	9,65 (5,62-16,57)
Toxoides tetánico	<0,1	<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	16	15	10	23	12	25

Los datos se expresan como media geométrica en intervalos de confianza del 95%. Para el toxoide de la tos ferina, la hemoaglutinina filamentosa, los aglutinógenos, la pertactina y los toxoides diftérico y tetánico, los títulos de anticuerpos se expresan en unidades de ELISA/ml. Para el ensayo de neutralización de células CHO, los valores reflejan la dilución mayor que demuestra el 80% de neutralización.

Tabla 3. Resultados serológicos de vacunas contra la tos ferina acelulares en lactantes (2, 4 y 6 meses de edad)

Prueba clínica	Valores geométricos medios "											Dif
	Producto	Estudio	n° de participantes	PT	FHA	69 kDa	Aglutinógenos fimbriales	Neutralización de las células de CHO	Aglutinación	Tét		
1	CP10/5/5DT	Estudio comparativo multicentro del US NIAID (Ciclo 1)	108	38	37	3	229	160	85	7,8	0,8	
	CP10/5/5/3DT		113	36	36	113	150	73	5,0	0,4		
	Célula completa (Mass.)		95	20	51	101	70	80	42	-	-	
	Célula completa (Lederle)		312	67	3	64	193	270	84	-	-	
2	CP10/5/5/3DT	Fase II Canada	315	87,1	50,2	29,9	239,8	29,6	-	1,5	0,3	
	Célula completa (CLL)		101	20	4,7	6,4	603,2	2,6	-	1,2	0,4	
3	CP10/5/5/3DT	Fase HB Canada	32	58,4	45,2	40,6	111,4	32,7	-	1,0	0,14	
	CP10/10/5/3DT		33	133,3	95,0	37,1	203,8	82,4	-	1,1	0,21	
	Célula completa (CLL)		30	10,4	8,9	6,8	393,9	4,0	-	1,8	0,31	
4	CP10/5/5/3DT	Fase IIC Canada	42	105,1	82,5	71,1	358,6	66,9	307,0	2,0	0,33	
	CP20/20/5/3DT		250	101,6	163,9	87,6	220,6	68,7	219,2	1,8	0,38	
5	CP20/20/5/3DT	Estudio de viabilidad de Montreal	58	212,7	83,4	106,3	601,9	109,6	-	1,9	0,53	
	Célula completa (CLL)		58	101,4	11,7	16,8	906,9	6,0	-	1,1	0,27	
6	CP10/5/3DT	Estudio comparativo del US NIAID (Ciclo II)	80	42	34	50	310	196	185	-	-	
	CP20/20/5/3DT		80	39	87	43	84	254	137	-	-	
	Célula completa (CLI)		80	2	3	9	33	54	167	-	-	
	Célula completa (Lederle)		80	18	2	16	29	137	86	-	-	
C.I.I - Connaught Laboratories Incorporated, Swiftwater, Pennsylvania.												
C.I.L. Connaught Laboratories Limited, Willowdale, Ontario.												
Mass - Massachusetts Public Laboratories.												
Lederle - Lederle Laboratories Inc.												

Tabla 4 - Eficacia de vacunas contra la tos ferina acelulares

Vacuna	Eficacia %	
	A	B
CP <sub>10/5/5/3</sub> DT	84,7 (80,3 → 88,5) <sup>1</sup>	77
PT <sub>25</sub> - FHA <sub>25</sub> DT	58 (49,8 → 64,8) <sup>1</sup>	
DPT <sup>2</sup>	47,9 (37,1 → 56,9) <sup>1</sup>	

A: definición del caso: Tos espasmódica de 21 días y cultivo positivo

B: definición del caso: Tos de tos ferina leve de por lo menos un día

Nota 1: Límites de confianza

Nota 2: Vacuna contra la tos ferina de células completas

## Referencias

- 5 1. Muller, A.S. Leeuwenburg, J. y Pratt, D.S. (1986) Pertussis: epidemiology and control. Bull WHO 64: 321-331.
2. Fine, P.E.M. y Clarkson, J.A. (1984). Distribution of immunity to pertussis in the population of England and Wales. J. Hyg. 92:21-26.
- 10 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., y Phillips, R. (1991). A pertussis outbreak in a Wisconsin nursing home. J. Infect. Dis. 164: 704-710.
- 15 5. Halperin, S.A. y Marrie, T.J. (1991a). Pertussis encephalopathy in an adult: case report and review. Rev. Infect. Dis. 13: 1043-1047.
6. Onorato, I.M., Wassilak, S.G. y 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., y Brawson, N.S.B. (1981). Pertussis immunization and serious acute neurological illness in children. Brit Med. J. 282: 1595-1599.
- 25 8. Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M., y 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. y Weiss, A. (1985). Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory epithelial cells. J. Infect. Dis. 152:118-125.
- 30 10. Friedman, R-L., Nordensson, K., Wilson, L., Akporiaye, E.T., y Yocum D.E. (1992). Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. Infect. Immun. 60: 4578-4585
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
- 35 12. Granstrom, M. y Granstrom G. (1993). Serological correlates in whooping cough. Vaccine 11:445-448.
13. Gearing, A.J.H., Bird, C.R., Redhead, K., y Thomas, M. (1989). Human cellular immune responses to *Bordetella pertussis* infection. FEMS Microbiol. Immunol. 47: 205-212.
- 40 14. Thomas, M.G., Redhead, K., y 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., y 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.
- 45 16. Tomoda, T., Ogura, H., y 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., Capiou, C., y Heron, I. (1992a). Proliferative responses and gamma interferon and tumor necrosis factor production by lymphocytes isolated from trachcbroncheal lymph nodes and spleens of mice aerosol infected with *Bordetella pertussis*. Infect. Immun. 60: 4563-4570
- 55 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., y the NIAID Acellular Pertussis Vaccine Group. (1992b). Effect of transplacental antibody and development of pertussis toxin (PI) and filamentous haemagglutinin (FHA) antibody after acellular (AC) and whole cell (WC) pertussis vaccines in infants. *Pediat. Res.* 31:91A.
- 5 19. Oda, M., Cowell, J.L., Burstyn, D.G., Thaib, S., y 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.
- 10 20. Petersen, J.W., P.H. Bentzon, M.W., Capiou, C., y 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., y 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.
- 15 22. Sato, H., Ito, A. Chiba, J. y Sato, Y. (1984b). Monoclonal antibody against pertussis toxin: effect on toxin activity and pertussis infections. *Infect. Immun.* 46: 422-428.
23. Sato, H. y Sato, Y. (1990). Protective activities in mice of monoclonal antibodies against pertussis toxin. *Infect. Immun.* 58: 3369-3374.
- 20 24. Weiss, A.A. y Hewlett, E.L. (1986). Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Ann. Rev. Microbiol* 40: 661-668.
- 25 25. Munoz, J.J. (1988). Action of pertussigen (pertussis toxin) on the host immune system. In: Pathogenesis and Immunity in Pertussis. A.C. Wardlaw y R. Parton, eds., John Wiley & Sons Ltd., Toronto. pp. 211-229.
- 26 26. Watkins, P.A., Burns, D.L., Kanaho, Y., Liu, T-Y., Hewlett E.L., y Moss, J. (1985). ADP-ribosylation of transducin by pertussis toxin. *J. Biol. Chem.* 260: 13478-13482.
- 27 27. Burns, D.L., Kenimer, J.G., y Manclark, C.R. (1987). Role of the A subunit of perussis toxin in alteration of Chinese hamster ovary cell morphology. *Infect. Immun.*, 55: 24-28.
- 30 28. Munoz, J.J., Arai, H., y Cole, R.L. (1981). Mouse-protecting and histamine-sensitizing activities of pertussigen and fimbrial hemagglutinins from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 32: 243-250.
- 35 29. Relman, D.A., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R., y Falkow, S. (1989). Filamentous haemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2637-2641.
- 30 30. Di Tommaso, A., Domenighini, M., Bugnoli, M., Tagliabuc, A., Rappuoli, R., y 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 31. Tomoda, T., Ogura, H., y 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.
- 45 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., y the NIAID Acellular Pertussis Vaccine Study Group (1992). Comparison of thirteen acellular pertussis vaccines: serological response. *Pediatr. Res.* 31:91A.
- 50 33. Kimura, A., Mountzoutos, K.T., Relman, D.A., Falkow, S., y 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.
- 34 34. Shahin, R.D., Amsbaugh, D.F., y Leef, M.F. (1992). Mucosal immunization with filamentous haemagglutinin protects against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect. Immun.* 60: 1482-1488.
- 55 35. Montaraz, J.A., Novotny, P. y Ivanyi, J. (1985). Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 161: 581-582.
- 60 36. Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J.G., Charles, I.G., Fairweather, M., Novotny, P., y 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.
- 65 37. De Magistris, T., Romano, M., Nuti, S., Rappuoli, R. y 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., y 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.
- 5 39. Podda, A., Nencioni, L., Marsili, I., Peppoloni, S., Volpini, G., Donati, D., Di Tommaso, A., De Magistris, M.T., y 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.
- 10 40. Roberts, M., Tite, J.P., Fairweather, N.F., Dougan, G. y 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., y 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.* 164: 114-122.
- 15 42. Shahin, R. D., Brennan, M.J., Li. Z.M., Meade, B.D., y 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.
- 20 43. Robinson, A., Irons, L.I., y 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., y Irons, L.I. (1985b). Protection against intranasal infection of mice with *Bordetella pertussis*. *Develop. Biol. Stand.* 61: 165-172
- 25 45. Robinson, A., Gorrige, A.R., Funnell, S.G.P., y Fernandez, M. (1989b). Serospecific protection of mice against in infection with *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 7: 321-324.
46. Sato, Y., Kimura, M., y Fukumi, H. (1984a). Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* i: 122-126.
- 30 47. Kimura, M. (1991). Japanese clinical experiences with acellular pertussis vaccines. *Develop. Biol. Standard.* 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* : 955-960.
- 35 49. Olin, P., Storsaeter, J., y Romanus, V. (1989). The efficacy of acellular pertussis vaccine. *JAMA* 261:560.
50. Storsaeter, J., Hallander, H., Farrington, C.P., Olin, P., Moliby, R., y Miller, E. (1990). Secondary analyses of the efficacy of two acellular pertussis vaccines evaluated in a Swedish phase III trial. *Vaccine* 8: 457-462.
- 40 51. Storsaeter, J., y Olin, P. (1992). Relative efficacy of two acellular pertussis vaccines during three years of passive surveillance. *Vaccine*: 10: 142-144.
- 45 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., y 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.
- 50 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., y Robbins, J.B. (1988). Clinical, metabolic, and antibody responses of adult 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., y 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 55. Sekura, R.D. et al. (1993), *J.Biol. Chem.* 258: 14647-14651.
- 60 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.
- 65 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.
- 5 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.
- 10 63. Siber, G., Winberry, L., Todd, C., Samore, M., Sentissi, A., y Cohen, N. (1988). Safety and immunogenicity in adults of pertussis toxoid inactivated with tetronitromethane. In: International Workshop on *Bordetella pertussis*, Rocky Mountain Laboratories, Hamilton, Montana.
- 15 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., y Wright, P.F. (1989). Evaluation of a new highly purified pertussis vaccine in infants and children. J. Infect. Dis. 160: 832-837.
- 20 65. Rutter, D.A., Ashworth, L.A.E., Day, A., Funnell, S., Lovell, F., y Robinson, A. (1988). Trial of new acellular pertussis vaccine in healthy adult volunteers. Vaccine 6: 29-32.
- 25 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., y 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.
- 30 67. Englund, J.A., Glezen, W.P. y 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, pp. 413-427.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de la forma purificada de toxoide de la tos ferina, hemoaglutinina filamentosa, pertactina y aglutinógenos fimbriales de *B. pertussis* en la elaboración de una preparación de vacuna de combinación contra la enfermedad causada por *B. pertussis*, para la administración a una población humana en situación de riesgo de enfermedad causada por *B. pertussis* para proporcionar protección contra la enfermedad causada por *B. pertussis* en la que cada dosis humana única de la preparación de vacuna contiene los antígenos de tos ferina siguientes, a saber de 5 a 30 µg de nitrógeno de dicho toxoide de la tos ferina, 5 a 30 µg de nitrógeno de dicha hemoaglutinina filamentosa, 3 a 15 µg de nitrógeno de pertactina, y 1 a 10 µg de nitrógeno de aglutinógenos fimbriales 2 (Agg2) y 3 (Agg3) y en la que la relación en peso de Agg2 a Agg3 es de 1,5:1 a 2:1 y en la que dicha preparación de vacuna proporciona dicha protección contra la enfermedad causada por *B. pertussis* en por lo menos el 70% de los miembros de una población en situación de riesgo que se puede determinar por un ensayo de eficacia clínica y en la que dicha vacuna está sustancialmente exenta de aglutinógeno 1 fimbrial.
- 10
- 15 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha preparación de vacuna contiene por lo menos un inmunógeno distinto de *Bordetella*.
3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha preparación de vacuna contiene:
- 20 (a) 10 µg de nitrógeno de toxoide de la tos ferina, 5 µg de nitrógeno de hemoaglutinina filamentosa, 3 µg de nitrógeno de aglutinógenos y 5 µg de nitrógeno de pertactina en una dosis humana única; o
- (b) 20 µg de nitrógeno de toxoide de la tos ferina, 20 µg de nitrógeno de hemoaglutinina filamentosa, 3 µg de nitrógeno de aglutinógenos y 5 µg de nitrógeno de pertactina en una dosis humana única.
- 25
4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la extensión de la protección es de por lo menos 80% para un caso de tos ferina que presenta una tos espasmódica de una duración de por lo menos 21 días y una infección bacteriana confirmada.
- 30
5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la extensión de la protección es de por lo menos 70% para un caso de tos ferina leve que presenta una tos de por lo menos un día de duración.
- 35
6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha preparación de vacuna incluye un adyuvante.

Figura 1

