

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 448**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2005 E 05757953 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **07.03.2007 EP 1758609**

54 Título: **Vacuna contra VPH16 y VPH18 y al menos otro tipo de VPH seleccionado de entre VPH 31, 45 o 52**

30 Prioridad:

16.06.2004 GB 0413510
26.04.2005 US 114301

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2013

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART, BE

72 Inventor/es:

DEBRUS, SERGE GLAXOSMITHKLINE
MARTIN, MARIE-THERESE;
STEPHEN, ROBERT JOHN GLAXOSMITHKLINE;
STEPHENNE, JEAN GLAXOSMITHKLINE y
WETTENDORFF, MARTINE, ANNE, CÉCILE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 394 448 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

Vacuna contra VPH16 y VPH18 y al menos otro tipo de VPH seleccionado de entre VPH 31, 45 o 52.

La presente solicitud se refiere a vacunas contra papilomavirus humanos.

Antecedentes de la invención

5 Los papilomavirus son pequeños virus de tumores de ADN, que son altamente específicos de especies. Hasta ahora, se han descrito por encima de 100 genotipos de papilomavirus humanos individuales (VPH). Los VPH son generalmente específicos o bien de la piel (por ejemplo, VPH - 1 y - 2) o de superficies mucosas (por ejemplo, VPH - 6 y -11) y usualmente producen tumores benignos (verrugas) que persisten durante varios meses o años. Tales tumores benignos pueden ser preocupantes para los individuos a los que atañe pero no son amenazantes para la vida, con unas pocas excepciones.

Algunos VPH también están asociados a cánceres, también conocidos como tipos de VPH oncogénicos. La asociación positiva más fuerte entre un VPH y cáncer humano es la que existe entre VPH - 16 y VPH - 18 y carcinoma de cuello de útero. El cáncer de cuello de útero es la malignidad más común en los países en desarrollo, con aproximadamente 500.000 nuevos casos que se producen en el mundo cada año.

15 Otros VPH de particular interés con respecto a cáncer son los tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 26, 53, y 66.

Las partículas similares a virus VPH (PLV) se han sugerido como vacunas potenciales para tratamiento de VPH. Una vacuna bivalente que utiliza las PLV se ha mostrado que es eficaz en la prevención de infección con los tipos 16 y 18 de VPH en mujeres jóvenes (Lancet, vol 364, publicación 9447, noviembre de 2004, páginas 1757 - 1765). El documento WO 03/077942 divulga una composición de vacuna compuesta de una mezcla en proporción igual de VPH 16, 18, 31 y 45.

Todavía existe una necesidad de una vacuna que proteja contra los tipos múltiples de VPH (por ejemplo > 2).

La presente invención se dirige a esta necesidad.

Sumario de la invención

25 La presente invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende las PLV de VPH 16 y 18 y al menos otro tipo de cáncer de VPH, el otro tipo de cáncer se selecciona entre la lista que consisten en los tipos 31, 45 y 52 de VPH, en los que la dosis de la PLV de al menos otro de los tipos de cáncer se reduce con relación a la del VPH 16 ó 18.

30 La invención se refiere, además, a una composición inmunogénica como se ha definido anteriormente en combinación con un adyuvante y/o vehículo.

La invención se refiere, además, a una vacuna que comprende una composición inmunogénica como se ha definido anteriormente con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 La invención se refiere, además, a un procedimiento de prevención de infección y/o enfermedad de VPH que comprende la administración a un individuo en necesidad del mismo de una composición o vacuna como se ha definido anteriormente.

La invención se refiere, además, a un procedimiento para preparar una composición inmunogénica como se ha definido anteriormente que comprende la mezcla de las PLV de los VPH 16 y 18 con al menos otro tipo de cáncer de VPH, el otro tipo de cáncer seleccionándose entre la lista que consisten en los tipos 31, 45, y 52 de VPH, en los que la dosis de la PLV de al menos otros tipos de cáncer se reduce con relación a la de los VPH 16 ó 18.

40 Los aspectos anteriores de la invención también pueden emplear capsómeros de VPH en lugar de las PLV.

Descripción detallada

Los inventores han determinado sorprendentemente que las PLV de los VPH 16 y 18 pueden proporcionar protección cruzada contra infección y/o enfermedad por ciertos tipos de cáncer distintos de VPH, es decir, VPH 31, VPH 45 y VPH 52. Los datos se proporcionan en los ejemplos en esta memoria descriptiva.

45 La protección cruzada se puede considerar como la protección proporcionada por una vacuna que contiene un tipo de VPH contra infección (incidente o persistente) y/o enfermedad producida por un tipo de VPH diferente. La infección incidente y persistente se definen como en la publicación de Lancet por Harper y col., vol. 364, publicación 9447, noviembre 2004, páginas 1757 - 1765. La protección cruzada se puede evaluar considerando la eficacia de la vacuna (V. E.), en al que la V. E. es el % de mejora en protección contra la infección por la vacuna comparada con un grupo placebo para un tipo dado.

- De acuerdo a lo anterior, las vacunas de VPH que comprenden las PLV de VPH 16 y 18 se pueden formular usando una dosis inferior de otros tipo de PLV de cáncer (no - VPH 16/18) (31, 45 ó 52) que de otra manera se requerirían en ausencia de las PLV de VPH 16 y 18, mientras que todavía logran la misma respuesta protectora contra infección por VPH incidente y/o persistente para ese otro tipo. Puede ser ventajosa la reducción de la dosis de las PLV de otro tipo de cáncer en un escenario de vacuna multivalente, sin impacto significativo sobre la protección producida por aquellos otros tipos cuando la cantidad total de antígeno se puede limitar; por ejemplo, mediante restricciones físicas, químicas o reguladoras. También se permite que se produzcan más dosis de una vacuna para una cantidad dada de antígeno y puede potencialmente reducir el coste global de la vacuna.
- La dosis de PLV en esta memoria descriptiva es convenientemente la cantidad de PLV, medida en peso.
- En otras palabras, para lograr la misma respuesta protectora contra infección incidente y/o persistente, la dosis de otros PLV de tipo canceroso (no VPH 16/VPH 18) que necesitan usarse en combinación con las VLP de VPH 16 y/o VPH 18 se pueden reducir comparada con el nivel que se requiere en ausencia de tales tipos de PLV 16 y/o 18.
- De este modo la invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende las PLV de los VPH 16 y 18 y al menos otro tipo de cáncer de VPH, el otro tipo de cáncer seleccionándose entre la lista constituida los por tipos 31, 45 y 52 de VPH, en los que la dosis de la PLV de al menos otros tipos de cáncer se reduce con relación al de VPH 16 ó 18.
- En un aspecto alternativo la invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende las PLV de los VPH 16 y 18 y al menos otro tipo de cáncer de VPH, el otro tipo de cáncer seleccionándose entre la lista constituida los por tipos 31, 45 y 52 de VPH, en los que la dosis de la PLV de al menos otros tipos de cáncer se reduce con relación a los que se requieren de otra manera, en ausencia de las PLV de VPH 16 y 18, que genera la misma protección contra infección por VPH incidente y/o persistente por ese tipo otro tipo de cáncer.
- En un aspecto la dosis del otro PLV de tipo canceroso (no VPH 16, 18) es suficiente para proporcionar protección contra infección incidente y/o persistente por ese tipo, y en un aspecto de la invención la protección de la invención contra al menos infección incidente.
- En un aspecto de la invención la composición de la invención es adecuada para protección de infección y /o enfermedad en sujetos humanos.
- Se puede determinar una dosis adecuada mediante, por ejemplo, ensayos en seres humanos tales como los descritos en los ejemplos en esta memoria descriptiva.
- La protección contra la infección incidente y/o persistente mediante un tipo de VPH dado, tal como por ejemplo VPH 16, 18, 31, 45 ó 52, la protección es convenientemente en el 50% de una población vacunada contra infección por ese tipo, y en un aspecto de la invención es 60% de protección, en un aspecto adicional 70% de protección, en un aspecto adicional 80% de protección, en un aspecto adicional 90% de protección, en un aspecto adicional 95% de protección, en un aspecto adicional 96% de protección, en un aspecto adicional 97% de protección, en un aspecto adicional 98% de protección, en un aspecto adicional 99% de protección y todavía en un aspecto adicional 100% de protección.
- Convenientemente esta protección se evalúa sobre un período de al menos 6 meses, tal como durante un período de al menos 9 meses, al menos 1 año, al menos 18 meses, convenientemente durante un período de 2 años o más de 2 años.
- En un aspecto de la invención, la protección se ve contra infección o enfermedad producida por VPH 16 y/o VPH 18, y en un aspecto infección y/o enfermedad tanto por VPH 16 como VPH 18.
- La prevención de la infección se puede evaluar mediante análisis de especies de VPH presentes en individuos vacunados, por ejemplo mediante análisis de PCR y/o técnicas de hibridación tales como las descritas en los documentos WO 03014402 y WO 9914377, incorporados en esta memoria descriptiva como referencia.
- Cuando la composición inmunogénica de la invención comprende las PLV tanto de VPH 16 como 18 entonces las PLV de tipo canceroso no de VPH 16/18 es tipo 31, o tipo 45, o tipo 52, o una combinación de los mismos. En un aspecto la composición inmunogénica de la invención comprende las PLV de VPH 16, 18, 31 y 45. En un aspecto la composición inmunogénica de la invención comprende las PLV de VPH 16, 18, 31 y 52. En un aspecto la composición inmunogénica de la invención comprende las PLV de VPH 16, 18, 45 y 52. En un aspecto la composición inmunogénica de la invención comprende las PLV de VPH 16, 18, 31, 52 y 45. Cuando hay 2 o más otras PLV de tipo canceroso (por ejemplo, 31, 45, 31 y 52, 45 y 52), entonces al menos uno de estos otros tipos de cáncer está presente a una dosis que se reduce al de VPH 16 o VPH 18.
- En un aspecto la dosis de VPH 31 se reduce con relación a la del VPH 16.
- En un aspecto la dosis de VPH 52 se reduce con relación a la del VPH 16.
- En un aspecto la dosis de VPH 45 se reduce con relación a la del VPH 18.

Convenientemente las composiciones inmunogénicas como se han definido anteriormente proporcionan protección contra infección incidente y/o infección persistente y/o enfermedad producida por VPH 16, VPH 18 y uno o más de los otros tipo de VPH (31, 45 ó 52) presentes en los grupos enumerados anteriormente, tal como infección incidente.

5 Cuando una composición inmunogénica de la invención comprende las PLV de VPH 16 pero no las PLV de VPH 18 entonces convenientemente el tipo de cáncer de PLV no VPH 16/18 es el tipo 31 y/o tipo 52.

Cuando una composición inmunogénica de la invención comprende las PLV de VPH 18 pero no las PLV de VPH 16 entonces convenientemente el tipo de cáncer de PLV de VPH 16/18 es el tipo 45.

En un aspecto de la invención la composición comprende las PLV de VPH 16 y 18 en combinación con cualquiera o las PLV de tanto VPH 31 como VPH 45.

10 En un aspecto de la invención la composición comprende al menos las PLV de VPH 16 en combinación con las PLV de VPH 31.

La composición de la invención puede comprender, además de las PLV a dosis reducida, otras PLV de VPH a cualquier dosis adecuada. Por ejemplo, la composición de la invención puede comprender tipos de cáncer de "alto riesgo" tal como uno o más de los VPH 33, 35, 39, 51, 56, 58, 59, 66, ó 68.

15 En un aspecto la composición puede comprender los también llamados tipos de "verrugas genitales" tales como VPH 6 y/u 11, o también llamados tipos "de piel" tales como VPH 5 y/u 8. En un aspecto las PLV adicionales están presentes a la misma dosis o mayor que VPH 16y/o VPH 18.

En un aspecto de la invención la composición comprende las PLV de VPH 39 y VPH 51 y la dosis de al menos uno de éstos se reduce con relación a VPH 16 y/o VPH 18.

20 En un aspecto la cantidad de cualquier PLV adicional se selecciona de manera que proporcione algún grado de protección contra infección o enfermedad contra el (los) tipo(s) adicionales.

Ciertas composiciones de la invención, individualizadas a continuación, comprenden la siguiente dosis de las PLV:

Número de composición	PLV de VPH 16 (µg)	PLV de VPH 18 (µg)	PLV de VPH 31 (µg)	PLV de VPH 16(µg)
1	20	20	10	10
2	20	30	10	10
3	20	30	20	20
4	30	20	10	10
5	30	20	20	20

25 Convenientemente no existe interferencia significativa o biológicamente relevante entre las PLV de VPH en la composición de la invención, de manera que la vacuna de PLV combinada de la invención es capaz de ofrecer protección eficaz contra la infección por cada tipo de PLV de VHP representada en la vacuna. Convenientemente la respuesta inmune contra un tipo de PLV dado en al combinación es al menos 50% de la respuesta inmune del mismo tipo de PLV cuando se mide individualmente, preferentemente 100% o sustancialmente 100%. Para respuestas de los componentes de VHP 16 y VHP 18, la vacuna combinada de la invención preferentemente estimula una respuesta inmune que es al menos 50% de la proporcionada por una vacuna de PLV de VHP 16 / VHP 18. Convenientemente la respuesta inmune generada por la vacuna de la invención está a un nivel en el que el efecto protector de cada tipo de PLV se ve todavía. La respuesta inmune se puede medir convenientemente, por ejemplo, mediante respuestas de anticuerpos que usan técnicas convencionales tales como ELISA, y mediante ensayos clínicos como se describen en esta memoria descriptiva.

30 En un aspecto la composición de la invención no comprende un proteína de choque por calor o fragmento de la misma.

En un aspecto la composición de la invención no comprende una proteína o péptido L2 de VHP. En otro aspecto la composición de la invención comprende una proteína o péptido L2 de VHP.

40 Las PLV de VHP y procedimientos para la producción de las PLV se conocen bien en la técnica. Las PLV típicamente se construyen a partir de las proteínas estructurales L1 y L2 del virus, véanse por ejemplo, los documentos WO 9420137, WO 9629413 y WO 9405792. Cualquier PLV de VHP se puede usar en la presente invención tal como PLV de L1 o L1 + L2.

La formación de PLV se puede evaluar mediante técnicas convencionales tales como, por ejemplo, microscopía electrónica y dispersión de luz láser dinámica.

En un aspecto de la invención la PLV es una PLV L1 solamente.

La PLV puede comprender la proteína L1 de longitud completa.

5 En un aspecto de la invención la proteína L1 usada para formar la PLV es una proteína L1 truncada. Las proteínas L1 de VHP truncadas se describen en, por ejemplo, el documento US 6361778, incorporado en esta memoria descriptiva como referencia. En un aspecto adicional el truncamiento es un truncamiento C terminal. En un aspecto adicional el truncamiento C terminal elimina menos de 50 aminoácidos, convenientemente y preferentemente menos de 40 aminoácidos. Convenientemente la secuencia de L1 de VHP 16 comienza en el segundo codón de metionina, por ejemplo como se muestra en la secuencia más adelante, o posiciones análogas en los otros tipos de VHP.
10 Cuando la PLV es una PLV de VHP 16 entonces en un aspecto el truncamiento C terminal elimina 34 aminoácidos de la secuencia de L1 de VHP 16. Cuando la PLV es una PLV de VHP 18 entonces en un aspecto el truncamiento C terminal elimina 35 aminoácidos de la secuencia de L1 de VHP 18.

En un aspecto la secuencia de VHP 16 es la secuencia siguiente:

MSLWLPSEATVYLPPVPVSKVVSTDEYVARTNIYYHAGT\$RLLAVGHPYFPIKKNNNKI	60
LVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKF\$GFPDTSFYNPDTQRLVWACVGV\$EVGRGQPLGVGISGH	120
PLLNKLLDDTENASAYAANAGVDNRECISMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGK\$GSPCTNVAV	180
NPGDCPPLELINTVIQDGMVDTGFGAMDF\$TTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSE	240
PYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRAGAVGENV\$PDDLYIKGSGSTANLASSNYFPTPSGSMV	300
TSDAQIFNKPYWLQRAQGH\$NNGICWGNQLFVTVVDTTRSTNMSLCAAISTSETTYKNTNF	360
KEYLRHGEEYDLQFFQLCKITLTADVMTYH\$SMNSTILEDWNFGLQPPP\$GGTLEDTYRF	420
VTSQAIACQKHTPPAPKEDPLK\$KYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFL\$LLQ	471

15 La secuencia de VHP 16 también puede ser la descrita en el documento WO 9405792 o US 6649167, por ejemplo, convenientemente truncada. Los truncamientos adecuados están truncados en una posición equivalente de manera como se ha mostrado anteriormente, como se determina mediante comparación de secuencias.

20 En un aspecto la secuencia de VHP 18 es la siguiente secuencia:

MALWRPSDNTVYLPPPSVARV\$VNTDDYVTRTSIFYHAGSSRLLTVGNP\$YFRVPAGGGNKQ	60
DIPKVSAYQYRVFRVQLPDPNKFGLP\$DNSIYNPETQRLVWACVGV\$EIGRGQPLGVGLSGH	120
PFY\$NKLDDTESSHAATS\$NVSEDVRDNVSV\$DYKQTQLCILGCA\$PAIGEHWAKGTACKSRPL	180
SQGD\$CPPLELKN\$TVLEDGDMVDTGY\$GAMDFS\$TLQDTKCEVPLD\$ICQSICKYPDYLQMSAD	240
PYGDSMFFCLRR\$EQLFARHF\$WNRAGTM\$GDTVPPSLYIKGT\$GMRASPGSCVY\$SPSPSGSIV	300
TSD\$QLFNKPYWLHKAQGH\$NNGVCWHN\$QLFVTVVDTTR\$STNLTICASTQ\$SPVPGQYDATK	360
FKQY\$SRHVEEYDLQFIFQLC\$TITLTADVMSYI\$HSMNSSILEDWN\$FGVPPPPTTSLVDTYR	420
FVQ\$SVAITCQKDAAPAENKDPYDKL\$KFWNVDLKEKFSLDLDQY\$PLGRKFLVQ	472

25 Una secuencia de VHP 18 alternativa se describe en el documento WO 9629413, que puede estar convenientemente truncada. Los truncamientos adecuados están truncados en una posición equivalente a la mostrada anteriormente, como se determina por comparación de secuencias.

Otras secuencias de VHP 16 y VHP 18 se conocen en la técnica y pueden ser adecuadas para uso en la presente invención.

30 Los truncamientos adecuados de VPH 31, VHP 45 y VHP 52 también se pueden realizar, adecuadamente retirando las porciones C terminales equivalentes de la proteína L1 a las descritas anteriormente como se determina mediante alineación de secuencias.

Las proteínas L1 truncadas se describen en, por ejemplo, los documentos WO 9611272 y US 6066324, que se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia.

5 En un aspecto las proteínas L1 truncadas son convenientemente derivados de la proteína L1 funcional, capaces de inducir una respuesta inmune (si es necesario, cuando convenientemente se acompaña de adyuvante), dicha respuesta inmune siendo capaz de reconocer una PLV que consisten en la proteína L1 de longitud completa y/o el tipo de VHP de la que se deriva la proteína L1.

10 Las PLV de la invención también pueden comprender otros tipos de derivados de proteínas funcionales, que incluyen mutantes de las proteínas L1 de VHP de longitud completa o truncadas tales como mutantes de supresión, sustitución, o inserción. La proteína L1 o derivada también puede ser una proteína de fusión, tal como la fusión de la proteína L1 con L2 o una proteína temprana. La proteína L1 del derivado de proteína funcional es capaz de formar una PLV, y la formación de PLV se puede determinar mediante técnicas convencionales tales como, por ejemplo, microscopía electrónica y dispersión de luz de láser dinámica.

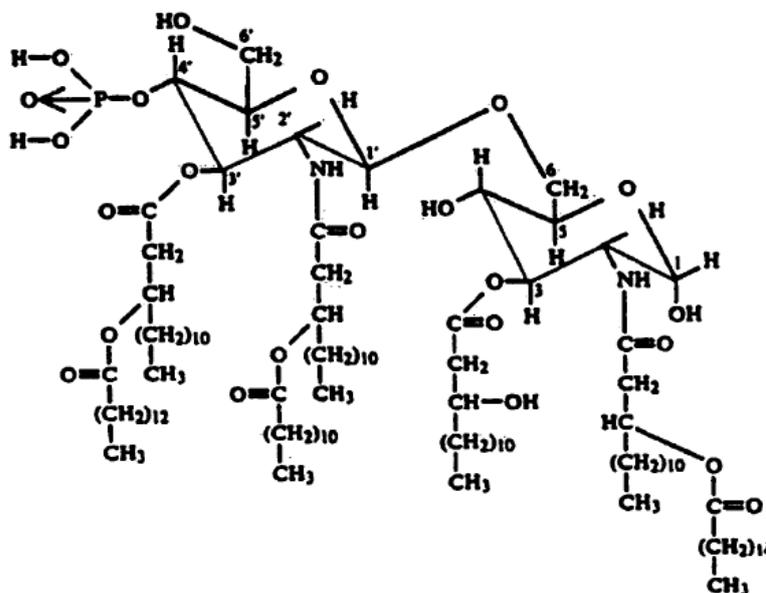
15 Las PLV también se pueden preparar en cualquier sustrato celular adecuado tal como células de levaduras o células de insecto, por ejemplo, células de baculovirus, y técnicas para la preparación de PLV se conocen bien en la técnica, tal como los documentos WO 9913056 y US 6245568, y las referencias en ellos, cuyos contenidos se incorporan en esta memoria descriptiva como referencia.

20 En un aspecto las PLV se preparan mediante técnicas de desacoplamiento y reagrupación, que pueden proporcionar las PLV de papilomavirus más estables y/o homogéneos. Por ejemplo, McCarthy y col., 1988 "Quantitative Disassembly and Reassembly of Human Papillomavirus Type 11 Viruslike Particles in Vitro" J. Virology 72 (1): 33 - 41, describe el desacoplamiento y reagrupación de las PLV de VHP 11 L1 purificados a partir de células de insecto con el fin de obtener una preparación homogénea de las PLV. Los documentos WO 9913056 y US 6245568 también describen procedimientos de desacoplamiento y reagrupación para preparar las PLV de VHP.

25 En un aspecto las PLV de VHP de la invención se preparan como se describe en los documentos WO 9913056 y US 6245568.

Las PLV de la invención se pueden combinar con un adyuvante o inmunoestimulante tal como, pero sin limitación, lípido A detoxificado a partir cualquier secuencia y derivados no tóxicos del lípido A, saponinas y otros reactivos capaces de estimulación de una respuesta de tipo de TH1.

30 Se ha conocido desde hace tiempo que el lipopolisacárido enterobacteriano (LPS) es un potente estimulador del sistema inmune, aunque su uso en adyuvantes se ha restringido por sus efectos tóxicos. Un derivado no tóxico de LPS, lípido A monofosforilo (MPL), producido por la eliminación de grupo carbohidrato central y el fosfato de la glucosalina de extremo reductor, lo han descrito Ribi y col (1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p. 407 - 419) y tiene la siguiente estructura:



Una versión adicional detoxificada de MPL se produce por la eliminación de la cadena acilo de la posición 3 de la estructura central de disacárido, y se llama lípido A monofosforilo 3-O-desacilado (3D-MPL). Se puede purificar y preparar mediante los procedimientos mostrados en GB 2122204B, cuya referencia también divulga la preparación de lípido A difosforilo, y las variantes 3-O-desaciladas del mismo.

En un aspecto el 3D-MPL está en la forma de una emulsión que tiene un tamaño medio de partícula menor que 0,2 µm de diámetro, y su procedimiento de fabricación se describe en el documento 94/21292. Las formulaciones acuosas que comprenden el lípido A monofosforilo y un tensioactivo se han descrito en el documento WO 9843670A2.

El lipopolisacárido bacteriano derivado de adyuvantes a formularse en las composiciones de la presente invención se pueden purificar y procesar a partir de fuentes bacterianas, o como alternativa pueden ser sintéticas. Por ejemplo, el lípido A monofosforilo purificado se describe en Ribi y col., 1986 (anteriormente), y lípido A monofosforilo o difosforilo 3-O-desacilado derivado de *Salmonella sp.* se describe en el documento GB 2220211 y US 4912094. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (Hilgers y col., 1986, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79 (4): 392 - 6; Hilgers y col., 1987, *Immunology*, 60 (1): 141 - 6; y el documento EP 0 549 074 B1). En un aspecto el adyuvante de lipopolisacárido bacteriano es 3D - MPL.

De acuerdo a lo anterior, los derivados de LPS que se pueden usar en la presente invención son aquellos inmunoestimulantes que son similares en estructura a la de LPS o MPL o 3D - MPL. En otro aspecto de la presente invención los derivados de LPS pueden ser un monosacárido acilado, que es una sub - porción de la estructura anterior de MPL.

Las saponinas se describen en: Lacaille - Dubois, M y Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponinas. *Phytomedicine* vol. 2 pp. 363 - 386). Las saponinas son glicósidos esteroides o triterpenos ampliamente distribuidas en el reino vegetal y animal marino. Las saponinas se observa que forman soluciones coloidales en agua que forman espuma tras agitación, y que precipitan colesterol. Cuando las saponinas están cerca de las membranas celulares crean estructuras de tipo poro en la membrana que produce que la membrana reviente. La hemólisis de eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, que es una propiedad de ciertas, pero no todas, las saponinas.

Las saponinas se conocen como adyuvantes en vacunas para la administración sistémica. El adyuvante y actividad hemolítica de saponinas individuales se ha estudiado extensivamente en la técnica (Lacaille - Dubois y Wagner, anteriormente). Por ejemplo, Quil A (derivada de la corteza del árbol de Sur América Quillaza Saponaria Molina), y las fracciones de la misma, se describen en el documento US 5.057.540 y "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1 - 2): 1 - 55; y el documento EP 0 362 279 B1. Las estructuras particuladas, denominadas complejos estimulantes inmunes (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A son hemolíticas y se han usado en la fabricación de vacunas (Morein, B., documentos EP 0 109 942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). Las saponinas hemolíticas QWS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como adyuvantes sistémicos potentes, y el procedimiento de su producción se describe en la patente de Estados Unidos N°. 5.057.540 y el documento EP 0 362 279 B1. Otras saponinas que se han usado en estudios de vacunación sistémica incluyen las derivadas de otras especies vegetales tales como Gypsophila y Saponaria (Bomford y col., *Vaccine*, 10 (9): 572 - 577, 1992).

Un sistema potenciado implica la combinación de un derivado de lípido A no tóxico y un derivado de saponina particularmente la combinación de QS21 y 3D -MPL como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que la QS21 se inactiva con colesterol como se describe en el documento WO 96/33739.

En un aspecto el adyuvante es una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21 y 3D - MPL en una emulsión aceite en agua y se describe en el documento WO 95/17210.

De acuerdo a una realización de la presente invención se proporciona una composición acompañada de adyuvante con lípido A detoxificado o un derivado no tóxico del lípido A, más preferentemente acompañada de adyuvante con un lípido A monofosforilo o los derivados del mismo.

En un aspecto la composición adicionalmente comprende una saponina, más preferentemente QS21.

En un aspecto la formulación de adyuvante adicionalmente comprende una emulsión aceite en agua. La presente invención también proporciona un procedimiento para producir una formulación de vacuna que comprende la mezcla de una PLV de la presente invención junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como 3D-MPL.

Los componentes adicionales que están preferentemente presentes en una composición acompañada de adyuvante según la invención incluyen detergentes no tóxicos tales como los octoxinoles y polioxietilén ésteres como se describe en esta memoria descriptiva, particularmente t-hidroxiapatitafenoxi polietoxietanol (Triton X - 100) y monooleato de polioxietilén sorbitán (Tween 80); y sales biliares o derivados de ácido cólico como se describe en

esta memoria descriptiva, en particular desoxicolato o taurodesoxicolato sódico. En un aspecto la formulación de adyuvante comprende 3D - MPL, Triton - 100, Tween 80 y desoxicolato sódico, que se puede combinar con una PLV de VPH proporcionando una vacuna adecuada.

5 En una realización de la presente invención, la composición comprende una formulación de adyuvante vesicular que comprende colesterol, una saponina y un derivado de LPS. A este respecto la formulación de adyuvante puede comprender una vesícula unilamelar que comprende colesterol, que tiene una bicapa lipídica convenientemente comprendiendo dioleil fosfatidil colina, en la que la saponina y el derivado de LPS se asocian a, o están embebidas dentro, de la bicapa lipídica. Más preferentemente, estas formulaciones de adyuvantes comprenden QS21 como la saponina, y 3D - MPL y el derivado de LPS, en los que la relación de QS21: colesterol está entre 1:1 a 1:100
10 peso/peso, y lo más preferentemente 1:5 peso/peso. Tales formulaciones de adyuvantes se describen en el documento EP 0 822 831 B, cuya divulgación se incorpora en esta memoria descriptiva por referencia.

En un aspecto la composición de la invención se usan en combinación con aluminio, y se absorben convenientemente o parcialmente absorbidos en adyuvante de aluminio. Convenientemente el adyuvante es una sal de aluminio, que en un aspecto está en combinación con 3D MPL, tal como fosfato de aluminio y 3D MPL.

15 En otro aspecto el adyuvante es hidróxido de aluminio, opcionalmente en combinación con 3D MPL. En otros aspectos la composición es la combinación de las PLV con una sal de aluminio o con una sal de aluminio + 3D MPL. En un aspecto de la invención la sal de aluminio es hidróxido de aluminio.

La composición de la invención también puede comprender aluminio o un compuesto de aluminio como estabilizador.

20 La presente invención generalmente se refiere a combinaciones de PLV. Sin embargo, se aprecia que el componente esencial de la PLV es una proteína L1. Las proteínas L1 se asocian para formar pentámeros (capsómeros) que después se teselan (agrupan) para formar las PLV. Como tal la presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas como se ha descrito anteriormente comprendiendo proteína L1, o capsómeros que comprenden proteína L1, en lugar de PLV como se describe en esta memoria descriptiva. Convenientemente las proteínas L1 son capaces de estimular una respuesta inmune protectora. Convenientemente las proteínas L1 son conformacionalmente correctas.
25

Para evitar dudas la invención de este modo también se refiere al uso de derivados de L1 funcionales como se ha descrito anteriormente, tales como truncamientos de L1, mutantes por supresión, sustitución o inserción, y proteínas de fusión, convenientemente aquellos que son capaces de provocar una respuesta inmune capaz de reconocer un virus de VPH. Los capsómeros que comprenden tales proteínas también se incluyen en la presente invención. Los capsómeros como agentes inmunogénicos se describen en, por ejemplo, el documento WO 0204007. El documento WO 9901557 también describe composiciones que contienen capsómeros de VPH. Las proteínas L1, derivados y capsómeros se pueden usar de la misma forma como se ha descrito para las PLV anteriormente.
30

De este modo la invención también se puede ver que se refiere a una composición inmunogénica que comprende una proteína L1, o un derivado funcional de la misma, a partir de VPH 16 y 18 y al menos otro tipo canceroso de VPH, el otro tipo de cáncer seleccionándose entre la lista que consisten en los tipos de VPH 31, 45 y 52, en las que la dosis de proteína L1, o derivado de la misma, de al menos otro tipo de cáncer se reduce con relación a la del VPH 16 ó 18.
35

De este modo la invención se puede observar que se refiere a una composición inmunogénica que comprende un capsómero de VPH de VPH 16 y 18 y al menos otro tipo de cáncer de VPH, el otro tipo de cáncer seleccionándose entre la lista que consisten en los tipos de VPH 31, 45 y 52, en los que la dosis del capsómero de al menos otro tipo de cáncer se reduce con relación a la del VPH 16 ó 18.
40

En un aspecto la invención se refiere a una composición inmunogénica como se ha descrito anteriormente en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen por ejemplo tampones y agua.
45

Las composiciones y vacunas de la invención se pueden proporcionar y distribuir mediante cualquiera de una diversidad de vías tales como oral, tópica, subcutánea, mucosal (típicamente intravaginal), intravenosa, intramuscular, intranasal, sublingual, intradérmica y mediante supositorio.

En un aspecto de la invención la composición o vacuna se puede formular o co - administrar con un antígeno temprano de VPH, por ejemplo un antígeno seleccionado entre la lista que consisten en VPH E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, y E8. En un aspecto alternativa vacuna puede carecer de un antígeno temprano de VPH, por ejemplo un antígeno seleccionado entre la lista que consisten en VPH E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 y E8.
50

Opcionalmente la composición o vacuna también se puede formular o co-administrar con antígenos no - VPH. Convenientemente estos antígenos no VPH pueden proporcionar protección contra otras enfermedades, lo más preferentemente enfermedades transmitidas sexualmente tales como virus herpes simplex, VHB, clamidia y VIH. Los inventores particularmente prefieren que la composición o vacuna comprenda gD o un truncamiento de la misma
55

ES 2 394 448 T3

de VSH, convenientemente un truncamiento C terminal de de VSH - 2 conocido como gD2t. De esta forma la composición o vacuna proporciona protección contra tanto VPH como VSH.

5 La dosificación de la composición o componentes de vacuna variarán con la condición, sexo, edad y peso del individuo, la vía de administración y VPH de la vacuna. La cantidad también puede variar con el número de tipos de PLV. Convenientemente la distribución es de una cantidad de vacuna adecuada para generar una respuesta inmunológicamente protectora. Convenientemente cada dosis de vacuna comprende 1 - 100 µg de cada PLV, en un aspecto 5 - 80 µg, en un aspecto adicional 5 - 30 µg de cada PLV, en un aspecto adicional 5 - 20 µg de cada µg de cada PLV con todavía aspectos adicionales siendo específicamente 5 µg, 6 µg, 10 µg, 15 µg o 20 µg.

10 Las dosis adecuadas para uso en seres humanos típicamente incluyen 20 - 40 µg de PLV de VPH 16 y VPH 18, con dosis reducidas de los otros tipos de cáncer de VPH (31, 45, 52) como se ha descrito en esta memoria descriptiva, convenientemente a un nivel menor de 20 µg por PLV, convenientemente a un nivel que es capaz de provocar una respuesta protectora inmune en al menos algunos individuos vacunados.

15 Otras dosis adecuadas para uso en seres humanos pueden comprender cantidades inferiores de VPH 16 y/o 18, con tal que tales dosis sean protectoras en seres humanos como se puede determinar usando ensayos indicados en esta memoria descriptiva. Por ejemplo tales dosis pueden ser apropiadas cuando las PLV de la invención se combinan con adyuvantes fuertes.

En un aspecto la composición de la invención comprende 20 µg de VPH 16, 20 µg de VPH 18 y entre 5 - 18 µg de cada PLV del otro tipo de cáncer (31, 45 ó 52), por ejemplo 5 - 15 µg, y en un aspecto adicional específicamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 µg de PLV de cada tipo de cáncer de no VPH 16/18.

20 En un aspecto la composición de la invención comprende 10 - 15 µg de VPH 16, 10 - 15 µg de VPH 18 y entre 5 - 9 µg de cada PLV del otro tipo de cáncer (31, 45 ó 52), y en un aspecto específicamente 5, 6, 7, 8 ó 9 µg de PLV de cada tipo de cáncer de no VPH 16/18.

25 En un aspecto la relación en peso de PLV de VPH 16 a otro PLV de tipo canceroso (31, 45 ó 52) está en el intervalo de 1: 0,9 - 1:0,1 (VPH 16: otro tipo), convenientemente en el intervalo de 1: 0,9 - 1:0,3, convenientemente 1:0,8 - 1:0,4.

En un aspecto la relación en peso de PLV de VPH 18 a otro PLV de tipo canceroso (31, 45 ó 52) está entre 1:0,9 - 1:0,1, (VPH 18: otro tipo), convenientemente en el intervalo de 1:0,9 - 1:0,32, convenientemente 1:0,8 - 1:0,4.

30 En otras palabras, una dosis reducida es convenientemente 10 - 90% de la dosis de las PLV de VPH 16 o VPH 18, y en un aspecto es 20 - 80% de la dosis de las PLV de VPH 16 o VPH 18, en un aspecto adicional 30 - 70%, todavía en un aspecto adicional 30 - 60%, y específicamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la dosis de VPH 16 o VPH18.

En un aspecto la composición se usa convenientemente para prevenir uno o más de: infección por VPH - 16 y/o VPH - 18, infección por VPH - 16 y/o VPH - 18 persistente y neoplasia de cuello de útero asociada a VPH - 16 y/o VPH - 18.

35 Convenientemente el uso de la composición inmunogénica de la invención se usa para prevenir neoplasia de cuello de útero y/o infección incidente y/o infección persistente asociada a infección por otros tipos oncogénicos (no VPH 16, 18).

40 Convenientemente la composición inmunogénica de la invención se usa en la inmunización activa de adultos y mujeres adolescentes desde la edad de 10 años en adelante. Para todas las composiciones y vacunas de la invención la composición o vacuna se usa convenientemente para la vacunación de chicas adolescentes de edad entre 10 y 15, preferentemente 10 - 13 años. La composición o vacuna también se puede administrar a mujeres adultas de más edad después de un frotis de PAP anómalo o después de cirugía que sigue a la retirada de una lesión producida por VPH, o que son seronegativos y ADN negativo para tipos de cáncer de VPH. Las mujeres de 10 - 55 años son otro grupo diana adecuado. En otro aspecto la vacuna se puede usar en chicas y mujeres de todas las edades, desde niñas en adelante, en un aspecto adicional se puede proporcionar a chicos u hombres. En un aspecto adicional la vacuna se puede usar terapéuticamente en mujeres que son seropositivos para el virus de VPH.

En un aspecto la composición de la invención se usa para prevenir o tratar cáncer de cuello de útero, o estados patológicos CIN I, CIN II o CIN III producidos por infección por VPH.

50 En un aspecto la invención la vacuna se distribuye en un régimen de 2 ó 3 dosis, por ejemplo un régimen de 0, 1 mes o un régimen de 0, 2 meses, o un régimen de 0, 2, 6 meses o un régimen 0, 1 y 6 meses respectivamente. Convenientemente el régimen de vacunación incorpora una inyección de recuerdo después de 3 a 10 años, o 5 - 10 años, tal como preferentemente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 años. En un aspecto la composición o vacuna de la invención es una formulación de vacuna líquida, aunque la vacuna se puede liofilizar y reconstituir antes de administración. También se pueden usar las formulaciones tópicas tales como, por ejemplo, cremas intravaginales.

Las enseñanzas de todas las referencias en la presente solicitud, que incluye solicitudes de patente y patentes concedidas, se incorporan en esta memoria descriptiva en su totalidad por referencia.

5 Las composiciones y vacunas de la invención comprenden ciertos componentes de VPH como se ha establecido anteriormente. En un aspecto adicional de la invención la vacuna consta esencialmente de, o está que consisten en dichos componentes.

La presente invención se ilustra en esta memoria descriptiva como referencia a los siguientes ejemplos no limitantes con relación a la protección cruzada por las PLV de VPH 16 y VPH 18, y que muestra la producción de las PLV de VPH.

Ejemplo 1

10 Mujeres sanas entre las edades de 15 y 25 años se inmunizaron con una mezcla de PLV de L1 de VPH 16 y VPH 18. Las mujeres en el alistamiento eran: 1) seronegativas para VPH - 16 y VPH - 18; 2) negativas para infección por VPH de alto riesgo del cuello uterino (detectado por PCR de VPH); 3) tenían 6 o menos parejas sexuales vitalicias y 4) tenían frotis de PAP normales.

15 La mezcla comprendía, por dosis de 0,5 ml, 20 µg de PLV de L1 de VPH - 16, 20 µg de PLV de L1 de VPH - 18 y se acompañó de adyuvante con 500 µg de hidróxido de aluminio y 50 µg de 3D MPL. El grupo de placebo se inyectó con 500 µg de hidróxido de aluminio solo.

Se evaluó la eficacia de la vacuna (V. E.) contra tipos de VPH de cáncer de alto riesgo, en la que la V. E. es la % de mejora en la protección contra la infección por la vacuna comparada con un grupo placebo.

20 La protección cruzada se determinó detectando la presencia de ácido nucleico específico para diversos tipos oncogénicos en las vacunas y grupo de control. La detección se llevó a cabo usando técnicas como se describe en el documento WO 03014402, y las referencias en esta memoria descriptiva, particularmente para ampliación no específica de ADN de VPH y posterior detección de tipos de ADN usando un sistema de LiPA como se describe en el documento WO 99/14377, y en Kleter y col., [Journal of Clinical Microbiology (1999), 37 (8): 2508 - 2517], cuyos contenidos totales se incorporan en esta memoria descriptiva como referencia.

25 Sin embargo, cualquier procedimiento adecuado se puede usar para la detección de ADN de VPH en una muestra, tal como PCR específica de tipo que usa cebadores específicos para cada tipo de VPH de interés. Los cebadores adecuados los conocen los expertos en la técnica, o se pueden construir fácilmente dado que se conocen las secuencias de los tipos de VPH oncogénicos.

30 La eficacia de las vacunas se determinó contra las infecciones para los 12 tipos de cáncer de alto riesgo, tipos relacionados filogenéticamente con VPH - 16 (los grupos de, 31, 35, y 58; 31, 33, 35, 52 y 58) y los tipos relacionados filogenéticamente 30 VPH - 18 (45 y 59).

Un análisis inicial se llevó a cabo sobre una "ITT" (intención para tratar cohorte, que representa todos los individuos que recibieron al menos una dosis de vacuna). Estos datos se muestran en al tabla 1.

35 Los resultados presentados en al tablas 2 y 3 se refieren al grupo "ATP" (según el protocolo) para aquellos pacientes que cumplen con todos los criterios del ensayo. La tabla 2 es un análisis de punto medio con los datos tomados de todos los pacientes en el instante en que al menos el 50% de la cohorte estaba 18 meses después de su primera vacunación. La tabla 3 proporciona los resultados finales, todos los datos estando entre los sujetos a 18 meses después de la primera vacunación (mes 0). En el grupo PTA todos los pacientes recibieron 3 dosis de vacuna a los meses 0, 1 y 6 eran seronegativas a los 6 meses.

40 Como se demuestra por los datos presentados en al tabla 1, la inmunización con una mezcla de PLV de VPH 16 y VPH 18 proporcionó protección cruzada evidente contra otros tipos de VPH. En este punto los tamaños de muestra son demasiados pequeños para proporcionar un análisis estadístico riguroso, sin embargo os datos demuestran una tendencia positiva y sugieren que la inmunización con las PLV de VPH 16 y VPH 18 será eficaz contra infección con otros tipos de VPH.

45 Esto se confirmó a medida que el estudio progresaba.

Los detalles del protocolo se describen adicionalmente en el ejemplo 3.

La tabla 2 demuestra que el VPH 16 y VPH 18 proporcionan protección cruzada estadísticamente significativa contra el grupo de tipos de cáncer de alto riesgo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.

50 La tabla 3 demuestra que, excepto para los tipos relacionados con VPH - 18 (que muestran una tendencia muy baja), existe protección cruzada estadísticamente significativa contra los grupos de: VPH 31, 35, 58; VPH 31, 33, 35, 52, 58; y los 12 tipos de alto riesgo (tipos de no VPH - 16/18) evaluados.

El análisis posterior de los datos de ensayo han indicado que la vacuna de VPH 16 y 18 usada en los ejemplos 1

ES 2 394 448 T3

proporciona protección cruzada estadísticamente significativa contra la infección estadística incidente por VPH 31 (eficacia de vacuna 75,1%, $p = 0,007$). Mientras el tamaño de muestra no permita todavía conclusiones estadísticamente significativas a dibujarse sobre otros tipos, los datos sobre otros tipos tales como 39, 45, 51 y 52 demuestran una tendencia positiva y sugieren que la inmunización con las PLV de VPH 16 y VPH 18 serán eficaces contra la infección con otros tipos de VPH.

5

Los datos presentados en el ejemplo 3 proporcionan datos adicionales obtenidos en la muestra de estudio, y se centra en la protección cruzada proporcionada contra ciertos tipos específicos.

Tabla 1

Tipos de VPH analizados	Números de mujeres infectadas (grupo de vacuna)	% de mujeres infectadas (grupo de vacuna) = A	Números de mujeres infectadas (grupo de placebo)	% de mujeres infectadas (grupo de placebo) = B	% de eficacia de vacuna (1-(AB) x 100, ajustado para tamaño relativo de vacuna y grupo de placebo)	Límites de confianza del 95% - límite inferior	Límites de confianza del 95% - límite superior	P
VPH 31, 35, 58	5	1,1	11	2,4	55,1	-29,1	84,4	0,127
VPH 31, 33, 35, 52, 58	17	3,8	24	5,4	30,3	-29,7	62,6	0,252
VPH 45, 59	3	0,7	6	1,3	50,6	-99,7	87,6	0,309
VPH 31,33,35,39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	27	6,3	40	9,4	34,6	-6,5	59,9	0,086

10

Se tomaron muestras de pacientes a los 9, 12, 15 y 18 meses y se ensayaron para infección por VPH por los otros tipos especificados anteriormente.

Tabla 2 - Eficacia de vacuna después de tres dosis en la prevención de infecciones heterólogas incidentes.

15

Tabla 2: Eficacia de vacuna contra la infección con tipos relacionados filogenéticamente con VPH - 16, tipos relacionados filogenéticamente con VPH - 18, tipos relacionados filogenéticamente con VPH - 16 y/o VPH - 18 y todos los tipos exclusivos de alto riesgo exclusivos de la cohorte de VPH - 16 y VPH - 18 (mes 6 - 18)

Tipo de de infección	Tasa de ataque						Eficacia de vacuna			
	Vacuna			Placebo			%	Cla 95%		Valor de P
	N	n	AR	N	n	AR				
Relacionada con VPH -16	446	12	28	438	24	55	49,4	0,2	74,4	0,060
Relacionadas con VPH-16 *	423	29	6,9	423	46	6,9	37,0	1,6	59,6	0,052
Relacionada con VPH -18	442	9	2,0	449	16	3,6	42,9	-27,9	74,5	0,223
Relacionada con VPH -16/18	433	21	4,9	438	41	9,4	48,2	13,8	68,9	0,012
Relacionada con VPH -16/18	423	34	8,0	423	56	13,2	39,3	9,0	59,5	0,019
Alto riesgo **	383	53	13,8	386	88	22,8	39,6	17,7	55,7	0,001

N = número de sujetos en la cohorte especificada
n = número de sujetos con infección por VPH incidente
AR = tasa de ataque = n/N
CI al 95% = intervalo de confianza al 95%

ES 2 394 448 T3

Límite inferior = $1 - \exp(\log(\text{arvg} / \text{arp}) + 1,96 * \text{raíz cuadrada de } (1/\text{nv} - 1/\text{Nv} + 1/\text{np} - 1/\text{Np}))$

Límite superior = $1 - \exp(\log(\text{arv} / \text{arp}) - 1,96 * \text{raíz cuadrada de } (1/\text{nv} - 1/\text{Nv} + 1/\text{np} - 1/\text{Np}))$

cuando el número de casos en vacuna = 0

Límite inferior * = $1 - \exp(\log(\text{arvg}^* / \text{arp}^*) + 1,96 * \text{raíz cuadrada de } (1/(\text{nv} + 0,5) - 1/(\text{Nv} + 0,5) + 1/(\text{np} + 0,5) - 1/(\text{Np} + 0,5)))$

Límite superior * = $1 - \exp(\log(\text{arv}^* / \text{arp}^*) - 1,96 * \text{raíz cuadrada de } (1/(\text{nv} + 0,5) - 1/(\text{Nv} + 0,5) + 1/(\text{np} + 0,5) - 1/(\text{Np} + 0,5)))$

con: arv = tasa de ataque en receptores de vacuna

arp = tasa de ataque en receptores de placebo

nv = número de casos en receptores de vacuna

Nv = número de casos y no casos en receptores de vacuna

np = número de casos en receptores de placebo

Np = número de vasos y no casos en receptores de placebo

relacionados con VPH - 16: tipos 35, 31, 58 relacionados filogenéticamente con VPH - 16 sin considerar otros tipos de VPH

relacionados con VPH - 16 *: tipos 35, 31, 58, 33, 52 relacionados filogenéticamente con VPH - 16 sin considerar otros tipos de VPH

relacionados con VPH - 18: tipos 45, 59 relacionados filogenéticamente con VPH - 16 sin considerar otros tipos de VPH

relacionados con VPH - 16 y/o VPH - 18: tipos 35, 31, 58, 45, 59 relacionados filogenéticamente con VPH - 16 y/o VPH - 18 sin considerar otros tipos de VPH

relacionados con VPH - 16 y/o VPH - 18 *: tipos 35, 31, 58, 33, 52, 45, 59 relacionados filogenéticamente con VPH - 16 y/o VPH - 18 sin considerar otros tipos de VPH

** = tipos de alto riesgo exclusivos de VPH - 16 y VPH - 18

(Cont.)

5

Tabla 3

Tipo de VPH analizados	Número total de número de sujetos con información disponible por grupo	Número de mujeres infectadas (grupo de vacuna)	% de mujeres infectadas (grupo de vacuna)=A	Número de mujeres infectadas (grupo de placebo)	% de mujeres infectadas (grupo de placebo)=B	% de eficacia de vacuna (1 - (AB) x 100 ajustado para tamaño relativo de vacuna y grupo de placebo)	Límite de confianza al 95% - límite inferior	Límite de confianza al 95% - límite superior	P
VPH 31, 35, 58	412	11	2,7	26	6,3	57,9	15,9	78,9	0,012
VPH 31, 33, 35, 52, 58	403	28	6,9	48	12,2	43,0	11,0	63,5	0,015

VPH 45, 59	421	10	2,4	15	3,6	33,5	-46,3	69,8	0,319
VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	368	58	15,8	90	25,3	37,7	16,2	53,6	0,002

Se tomaron muestras de pacientes a los 18 meses y se ensayaron para infección por VPH por los otros tipos especificados anteriormente.

Ejemplo 2

- 5 Las PLV de VPH 16 y VPH 18 se produjeron de la siguiente manera:

Ejemplo 1:

La combinación de las PLV de VPH 16 y VPH 18 se detalla en esta memoria descriptiva. La proteína L1 de otros genotipos de VPH se pueden producir fácilmente mediante procedimientos similares, ya conocidos en la técnica.

- 10 A Preparación de PLV de VPH 16/18

Producción de PLV de VPH 16 y VPH 18 se llevó a cabo usando protocolos convencionales - por ejemplo, véase el documento WO 9913056, las proteínas de VPH 16/18 se expresan en células de *Trichoplusia ni* (High Five™) (a una densidad de aproximadamente 350000 células/ml) infectadas con baculovirus recombinante (MOI de 0,3) que codifica el gen de L1 de VPH 16 ó 18 de interés. Las células se recogieron aproximadamente 72 horas después de la infección.

4.1 B Recogida de células / extracción de antígeno

20 El antígeno (L1 - 16/18) se extrajo de células Hi5 en un procedimiento de tres etapas de concentración, extracción, clarificación. La etapa de concentración retira hasta el 90% del medio de cultivo, y se realizó mediante filtración de flujo tangencial. La etapa de extracción se realizó con un tampón hipotónico (Tris 20 mM, pH 8,5). Un volumen igual al volumen del cultivo se usó para realizar la extracción. Se usó un tiempo de contacto de mínimo una hora y media en agitación suave. La clarificación se realizó mediante filtración de flujo tangencial.

C Purificación

25 El procedimiento de purificación se llevó a cabo a temperatura ambiente. Se añadió β - mercaptoetanol (4% p/p) al extracto con el fin de disociar las PLV en cápsomeros, para ambos antígenos, L1 - 16/18. Se añadió glicerol hasta una concentración de 10% en peso justo antes de la adición de β - mercaptoetanol.

Todos los tampones usados se filtraron sobre filtros de 0,22 μm antes de almacenar a 2°C - 8°C. Antes de cada purificación, las matrices de gel se sanitizan y se equilibran con tampón apropiado antes de cargar la muestra.

Los regímenes de purificación se proporcionan para la purificación separada de L1 a partir de tanto VPH 16 como VPH 18. Estos esquemas son en sentido amplio similares, e implican las etapas de:

- 30 Cromatografía de intercambio aniónico (Di metil amino etilo - DMAE),
Cromatografía de intercambio aniónico (Tri metil amino etilo - TMAE),
Cromatografía en hidroxapatita,
Filtración nanométrica (Planova),
Ultrafiltración,
35 Cromatografía de interacción hidrófoba (usando octil sefarosa) para VPH 18 o cromatografía de intercambio aniónico (DEAE) para VPH 16; y filtración estéril.

4.1.1 Específicamente:

4.1.2 C1 Purificación de antígeno L1 - 18

- 40 4.1.2.1 Cromatografía de intercambio aniónico DMAE

El extracto clarificado (proteína a una concentración de aproximadamente 1g/ml, con la proteína L1 a aproximadamente 150 mg/ml) se aplica a una columna de intercambio aniónico (Di metil amino etilo). La elución se

ES 2 394 448 T3

realiza con tampón (Tris 20 mM / NaCl 200 mM / β - mercaptoetanol BME al 4%) pH $7,9 \pm 0,2$. El antígeno se eluye con aproximadamente 5 volúmenes de columna y el perfil de elución se controla a 280 nm.

4.1.2.2 Cromatografía de intercambio aniónico TMAE

5 El eluido de la primera etapa se diluye con 1 volumen de H₂O/BME al 4%. Después el eluido diluido se aplica a una segunda columna de intercambio aniónico (Trimetil amino etilo).

La elución se realiza con tampón (Tris 20 mM / NaCl 200 mM / BME al 4%) pH $7,9 \pm 0,2$. El antígeno se eluye con aproximadamente 4 volúmenes de columna y el perfil de elución se controla a 280 nm.

4.1.2.3 Cromatografía de hidroxiapatita

El eluido de la etapa de TMAE se aplica a una columna de hidroxiapatita (HA).

10 Después de la aplicación de la muestra, el gel se eluye con aproximadamente 2,5 volúmenes de columna de tampón (NaH₂PO₄ 100 mM / NaCl 30 mM / BME al 4%), pH $6,0 \pm 0,2$.

4.1.2.4 Filtración nanométrica (Planova)

15 El eluido de HA se diluye con el fin de alcanzar las siguientes condiciones: tampón (NaH₂PO₄ 25 mM / NaCl 10 mM / BME al 4%), pH $7,5 \pm 0,2$.

Después se filtra sucesivamente sobre un prefiltro de 0,2 μ m y sobre un filtro 15 N de 0,12 m². La filtración se realiza a una presión constante de 200 mbar (20 kPa) ± 20 (2 kPa) mbar.

4.1.2.5 Ultrafiltración

20 La ultrafiltración se realiza a con un sistema de ultrafiltración de flujo tangencial equipado con membranas de poliétersulfona (módulo de Centramate 0,1 m², 100 kD).

El eluido de Planova se trata para alcanzar las siguientes condiciones: (NaH₂PO₄ 100 mM / NaCl 30 mM / BME al 4%), pH $6,0 \pm 0,2$; después se carga en el sistema, se concentra cinco veces y se dia - filtra con inyección continua de aproximadamente 10 volúmenes de partida de tampón (NaH₂PO₄ 20 mM/ NaCl 500 mM), pH $6,0 \pm 0,2$.

4.1.2.6 Cromatografía de interacción hidrófoba (Octil Sefarosa)

25 El permeado de ultrafiltración se aplica a una columna de octil Sefarosa. Esta etapa de cromatografía se lleva a cabo en el modo negativo con aproximadamente 5 volúmenes de columna de tampón (Na₃PO₄ 20 mM/ NaCl 500 mM), pH $6,0 \pm 0,2$.

4.1.2.7 Filtración estéril

La solución de antígeno L1 - 18 purificada se esteriliza mediante filtración sobre una membrana de 0,22 μ m.

30 4.1.3

4.1.4 C2 Purificación de antígeno L1 - 16

4.1.4.1 Cromatografía de intercambio iónico DMAE

35 El extracto clarificado se aplica a una columna de intercambio aniónico (Di metil amino etilo). La elución se realiza con tampón (Tris 20 mM / NaCl 180 mM / BME al 4%) pH $7,9 \pm 0,2$. El antígeno se eluye con aproximadamente 4 volúmenes de columna y el perfil de elución se controla a 280 nm.

4.1.4.2 Cromatografía de intercambio aniónico TMAE

El eluido de la primera etapa se diluye con 1 volumen de H₂O/BME al 4%. Después el eluido diluido se aplica a una segunda columna de intercambio aniónico (Trimetil amino etilo).

40 La elución se realiza con tampón (Tris 20 mM / NaCl 180 mM / BME al 4%) pH $7,9 \pm 0,2$. El antígeno se eluye con aproximadamente 5 volúmenes de columna y el perfil de elución se controla a 280 nm.

4.1.4.3 Cromatografía de hidroxiapatita (HA)

El eluido de la etapa de TMAE se aplica a una columna de HA.

Después de la aplicación de la muestra, el gel se eluye con aproximadamente 3 volúmenes de columna de tampón (NaH₂PO₄ 100 mM/ NaCl 30 mM/ BME al 4%), pH $6,0 \pm 0,2$.

4.1.4.4 Filtración nanométrica (Planova)

El eluido de HA se diluye con el fin de alcanzar las siguientes condiciones: tampón (NaH₂PO₄ 25 mM / NaCl 10 mM / BME al 4%), pH 7,5 ± 0,2.

- 5 Después se filtra sucesivamente sobre un prefiltro de 0,2 µm y sobre un filtro 15 N de 0,12 m². La filtración se realiza a una presión constante de 200 mbar (20 kPa) ± 20 (2 kPa) mbar.

4.1.4.5 Ultrafiltración

La ultrafiltración se realiza a con un sistema de ultrafiltración de flujo tangencial equipado con membranas de poliétersulfona (módulo de Centramate 0,1 m², 100 kD).

- 10 El eluido de Planova se trata para alcanzar las siguientes condiciones: (NaH₂PO₄ 100 mM / NaCl 30 mM / BME al 4%), pH 6,0 ± 0,2; después se carga en el sistema, se concentra cinco veces y se dia - filtra con inyección continua de aproximadamente 10 volúmenes de partida de tampón (NaH₂PO₄ 20 mM/ NaCl 500 mM), pH 6,0 ± 0,2.

4.1.4.6 Cromatografía de intercambio aniónico DEAE

El eluido de ultrafiltración se ajusta a la conductividad del tampón de equilibrio, (Na₃PO₄ 20 mM / NaCl 250 mM), pH 6,0 ± 0,2 y se aplica a una columna de intercambio aniónico /Di etil amino etilo).

- 15 La elución se realiza con tampón (NaH₂PO₄ 20 mM / NaCl 500 mM), pH 6,0 ± 0,2. El antígeno se eluye con aproximadamente 3 volúmenes de columna y el perfil de elución se controla a 280 nm.

4.1.4.7 Filtración estéril

La solución de antígeno L1 - 16 purificada se esteriliza mediante filtración sobre una membrana de 0,22 µm.

C3

- 20 Cada tipo de PLV se adsorbe independientemente para producir un monovalente adsorbido concentrado.

Preparación de monovalente adsorbido concentrado de PLV16:

- 25 60 µg de PLV purificados de VPH16 se adsorben en 150 µg de Al⁺³ de Al(OH)₃, a un pH de 6,0 ± 0,2, durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Este monovalente adsorbido concentrado se almacena a +4°C. La adsorción se comprueba mediante centrifugación de al preparación y cuantificación de las PLV en el sobrenadante.

Preparación de monovalente adsorbido concentrado PLV18:

- 30 60 µg de PLV purificados de VPH18 se adsorben en 150 µg de Al⁺³ de Al(OH)₃, a un pH de 6,0 ± 0,2, durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Este monovalente adsorbido concentrado se almacena a +4°C. La adsorción se comprueba mediante centrifugación de al preparación y cuantificación de las PLV en el sobrenadante.

D. Preparación de vacuna final

Los monovalentes adsorbidos concentrados preparados mediante el procedimiento anterior se pueden combinar para formar una suspensión que contiene 20 µg de cada uno de las PLV por dosis. La vacuna final se almacena a +4°C.

- 35 La adición de las PLV de otros tipos de cáncer se puede añadir según sea apropiado, a concentración adecuada de acuerdo con la invención. Las secuencias de tales tipos se conocen en la técnica y los expertos en la técnica pueden fácilmente expresar las PLV que comprenden tales proteínas.

Las masas adsorbidas combinadas, o masas adsorbidas individuales, se pueden además mezclar con adyuvantes tales como 3D - MPL.

40 **Ejemplo 3**

Los detalles precisos del experimento llevado a cabo se proporcionan en Harper y col., the Lancet 2004 Nov 13; 364 (9447): 1757-65.

- 45 En resumen, mujeres sanas entre las edades de 15 y 25 años se inmunizaron con una mezcla de PLV L1 de VPH 18. Las mujeres en el alistamiento eran: 1) seronegativas para VPH - 16 y VPH - 18; 2) negativas para infección por VPH de alto riesgo del cuello uterino (detectado por PCR de VPH); 3) tenían 6 o menos parejas sexuales vitalicias y 4) tenían frotis de PAP.

La mezcla comprendía, por dosis de 0,5 ml, 20 µg de PLV de L1 de VPH - 16, 20 µg de PLV de L1 de VPH - 18 y se acompañó de adyuvante con 500 g de hidróxido de aluminio y 50 µg de 3D MPL. El grupo de placebo se inyectó con 500 µg de hidróxido de aluminio solo.

5 Las PLV de VPH 16 estaban constituidos por una proteína L1 de VPH de 471 aminoácidos, truncada terminalmente en C, con una supresión de 34 aminoácidos. Las PLV de VPH 18 están constituidas por una proteína L 1 de VPH truncada terminalmente en C de 472 aminoácidos, con una supresión de 35 aminoácidos.

Se determinó la eficacia de vacuna (V. E.) contra ciertos tipos de VPH cancerosos, en los que la V. E. es el % de mejora en protección contra infección por la vacuna comparado con un grupo de placebo.

10 La protección cruzada de determinó detectando la presencia de ácido nucleico específico para diversos tipos oncogénicos en las vacunas y grupo control. La detección se llevó a cabo usando técnicas como se describe en el documento WO 03014402 y las referencias en él, particularmente para la amplificación no específica de ADN de VPH y posterior detección de tipos de ADN usando un sistema de LiPA como se describe en el documento WO 99/14377, y en Kleter y col., [Journal of Clinical Microbiology (1999), 37 (8): 2508 - 2517], cuyo contenido total se incorporan en esta memoria descriptiva como referencia específicamente.

15 Sin embargo, cualquier procedimiento adecuado, se puede usar para la detección de ADN de VPH en una muestra, tal como PCR específico de tipo usando cebadores específicos para cada tipo de VPH en una muestra. Los cebadores adecuados los conocen los expertos en al técnica, o se pueden construir fácilmente con tal que las secuencias de los tipos de VPH oncogénicos se conozcan.

20 En detalle, la sección de procedimientos de la publicación de Lancet se reproduce en esta memoria descriptiva como referencia, para la verlo íntegramente:

25 Harper y col., the Lancet, 13 de noviembre de 2004; 364 (947); 1757-65 - **detalles ex perimentales**. El objetivo principal de este estudio era para determinar la eficacia de vacuna en al prevención de infección con VPH - 16, VPH - 18, o ambos (VPH - 16/489, entre los meses 6 y 18 en participantes que se mostró inicialmente que eran seronegativos para VPH - 16/18 mediante ELISA y negativos para ADN de VPH - 16/18 mediante PCR. Los objetivos secundarios incluían: evaluación de eficacia de vacuna en al prevención de infección persistente con VPH - 16/18, y la evaluación de la eficacia de la vacuna en al prevención de lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo confirmadas citológicamente (LSIL), lesiones intraepiteliales escamosas de grado alto (HSIL), y cáncer de células escamosas LSIL (CIN 1), HSIL (CIN 2 ó 2) confirmado histológicamente, adenocarcinoma asociado a infección por VPH - 16/18 entre los meses 6 y 8, y meses 6 y 27. La prevención de células escamosas atípicas de citología significación no determinada (ASCUS) asociada a la infección por VPH - 16/18 se añadió post - hoc a los análisis de los resultados.

35 Los inventores no hicieron un análisis exploratorios de los puntos finales histopatológicos CIN 1 y 2 asociados al ADN de VPH - 16/18 detectado mediante PCR en tejido de lesionado. Otros objetivos incluían la determinación de inmunogenicidad de vacuna, seguridad, y tolerancia.

Los investigadores en Norte América (Canadá y Estados Unidos) y Brasil reclutaron mujeres para este estudio de eficacia mediante anuncios o participación previa en el estudio de epidemiología seccional cruzado de VPH que tuvo lugar entre julio y diciembre de 2000.

40 Para cada uno de los 32 sitios de estudio, un panel de revisión institucional aprobó el protocolo, formas de consenso, y enmiendas. Las mujeres firmaron consentimientos escritos separados para la participación y colposcopia. Para las que eran menores de 18 años, eran obligatorios consentimiento de los padres y asentimiento del participante

Existían dos fases de estudio: una fase inicial para la vacunación y el seguimiento que concluía en el mes 18; y una fase de extensión de seguimiento a ciegas que concluyó el mes 27.

45 Las mujeres que se pueden elegir para la fase inicial (meses 0 - 18) incluían mujeres sanas de 15 - 25 años de edad, que no habían tenido más de 6 parejas sexuales, sin historial de un ensayo Pap anómalo o tratamiento por ablación o escisión del cuello uterino, y ningún tratamiento en curso para condilomata externo; y que eran citológicamente negativas, seronegativas para anticuerpos de VPH - 16 y VPH - 18 mediante ELISA, y negativas para ADN de VPH mediante PCR para 14 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, y 68) no más de 90 días antes del comienzo del estudio.

50 Las mujeres que completaron la fase inicial del mas temprano de los estudios, y que no tenían terapia por ablación o escisión del cuello uterino, o histerectomía después del alistamiento, se pudieron elegir para participar en la fase de extensión del estudio (meses 18 - 27).

Procedimientos

Cada dosis de las vacunas de partículas que parecen virus de VPH - 16/18 (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) contenía 20 µg de partícula que parece virus de L1 de VPH - 16 y 20 µg de partícula que parece virus de L1 de µg - 18. Cada tipo de partícula que parece virus se produjo sobre sustrato de células de *Spodoptera frugiperda* Sf - 9 y *Trichoplusia ni* Hi - 5 con adyuvante AS04 que contenía 500 µg de hidróxido de aluminio y 50 µg de 3- lípido monofosforilo 3-desacilado (MPL, Corixa, Montana, Estados Unidos) proporcionado en un vial monodosis. El placebo contenía 500 µg de hidróxido de aluminio por dosis, y era idéntico a en apariencia a la vacuna de µg - 16/18. Cada participante en el estudio recibió una dosis de 0 - 5 ml de vacuna o placebo a los 0 meses, 1 mes, y 6 meses.

Los Proveedores de asistencia sanitaria obtuvieron muestras de cuello uterino con un cepillo y espátula de cuello uterino (lavadas en PreservCyt, Cytoc Corporation, Boxborough, MA, Estados Unidos) para ensayo de citología y ADN de VPH en la selección y los meses 6, 12, y 18. En los meses 0 y 6, y posteriormente cada 3 meses, muestras cervicovaginales obtenidas de las propias mujeres con dos toma de muestras con escobillones sucesivas (colocados en PreservCyt) para ensayo de ADN de VPH. [DM Harper, WW Noll, DR Belloni y BF, Cole, Randomized clinical trial of PCR - determined human papillomavirus detection methods: self - sampling versus clinician - directed - biologic concordance and women's preferences. *Am. F Obstet Gynecol* 186 (2002), pp. 365 - 373]. Un laboratorio central (Quest Diagnostics, Teterboro, NJ, Estados Unidos) reseñó resultados citológicos (ThinPrep, Cytoc Corporation) mediante el uso del sistema de clasificación de Bethesda de 1991.

Las directrices de protocolo recomendaban colposcopia después de dos informes de ASCUS, o un informe de células glandulares atípicas de significación no determinada, LSIL o HSIL, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma *in situ*, o adenocarcinoma. Estas directrices también recomendaron biopsia para cualquier lesión sospechosa.

El laboratorio de histología central realizó una diagnosis inicial de las muestras de tejidos fijados por formalina para tratamiento clínico. Un panel de tres patólogos realizaron una diagnosis de consenso posterior para lesiones asociadas a VPH - 16 y VPH - 18 con el sistema CIN. Esta diagnosis de consenso también incluía una revisión de las secciones tomadas en el momento de la microsección para la detección por PCR de ADN de VPH de lesión.

El ADN de VPH aislado de la muestra citológica (MagNaPure Total Nucleic Acid system, Roche Diagnostics, Almere, Holanda) y de muestras de biopsia de cuello uterino (extracción de proteinasa K) se amplificó a partir de una alícuota de ADN total purificada con los cebadores de amplio espectro SPF10 que amplifican una región de 65 pares de bases del gen L1 [B. Kleter, LJ van Doom, J ter Schegget y col., Novel short - fragment PCR assay for highly sensitive broad - spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol* 153 (1998), pp. 1731 - 1739; LJ van Doom, W Quint, B Kleter y col., Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMY line blot assay and the SPF (10) line probe assay. *J Clin Microbiol* 40 (2002), pp. 979 - 983 y WG Quint, G Scholte, LJ van Doom, B Kleter, PH Smits y J. Lindeman, Comparative analysis of human papilloma virus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF (10) PCR and HPV genotyping. *J. Pathol* 194 (2001), pp. 51 - 58]. Los productos de amplificación se detectaron mediante un inmunoensayo de enzimas de ADN. Un ensayo de sonda lineal kit LiPA, ensayo de identificación de genotipo de VPH INNO LiPA VPH, sistema SPF - 10, versión 1, Inogenetics, Gent, Bélgica, fabricado por Labo Bio - medical Products Rijswijk, Holanda) detectó 25 genotipos de VPH (6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, y 74). [B. Kleter, LJ van Doom, L Schauwen y col., Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR - reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus *J. Clin Microbiol* 37 (1999), pp. 2508 - 2517]. Cualquier muestra que era positiva mediante inmunoensayo de enzimas de AND se ensayó mediante PCR de VPH - 16 y VPH - 18 específico de tipo. Los cebadores de PCR específico del tipo VPH - 16 amplificaron un segmento de 92 pares de bases del gen E6/E7 y cebadores de PCR específico del tipo VPH - 18 amplificaron un segmento de 126 pares de bases del gen L1 [MF Baay, WG Quint, J, Koudstaal y col, Comprehensive study of several general and type - specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin - embedded cervical carcinomas. *J. Clin Microbiol* 34 (1996), pp. 745 - 747]

Los inventores definieron invención del cuello uterino incidente con VPH - 16/18 con al menos un resultado de PCR positivo para VPH - 16 o VPH - 18 durante el ensayo, e infección persistente con VPH - 16/18 como al menos dos ensayos de VPH - ADN positivos para el mismo genotipo viral separado en al menos 6 meses. [H Richardson, Kelsall, P Tellier y col., The natural history of type - specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12 (2003), pp. 485 - 490 y AB Moscicki, JH Ellenberg, S Farhat y J. Xu, Persistence of human papillomavirus infection in HIV - infected and uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J. Infect Dis* 190 (2004), pp. 37 - 45] Los resultados de ensayos de HPV - DNA se escondieron a los investigadores durante el estudio y las diagnosis citológicas e histológicas se revelaron solamente para propósitos de tratamiento clínico. Los análisis incluían resultados de ADN de VPH - 16/18 para muestras de cuello uterino y muestras de cuello uterino y cervicovaginales combinadas.

Los inventores recogieron suero de los participantes de estudio en los meses 0, 1, 6, 7, 12, y 18 para las determinaciones de inmunogenicidad. El ensayo serológico para anticuerpos a las partículas que parecen virus de VPH - 16 y VPH - 18 fue mediante ELISA. Se usaron partículas que parecen virus de VPH - 16 y VPH - 18 como

antígenos de recubrimiento para la detección de anticuerpos (véase el apéndice de la página web <http://imaee.thelancet.com/extras/04art10103webappendix.pdf>). La seropositividad se definió como un título mayor que o igual al título de corte del ensayo establecido en 8 unidades/ml de ELISA para VPH - 16 y 7 unidades/ml de ELISA para VPH - 18. Los títulos naturales típicos se determinaron mediante el uso de muestras de sangre obtenidas de mujeres en el estudio de epidemiología anterior que se encontraron que eran seropositivas para VPH - 16 o VPH - 18 mediante ELISA.

Las mujeres registraron síntomas experimentados durante los 7 primeros días después de la vacunación en tarjetas diarias con una escala de tres grados de intensidad de síntomas. Adicionalmente, reseñaron al personal de estudio mediante entrevista de todos los episodios adversos en los 30 primeros días después de la vacunación. La información sobre los episodios adversos graves y embarazos se recogió a lo largo del estudio.

Procedimientos estadísticos

Asumiendo una tasa acumulada de incidencia del 60 de infecciones tanto del tipo VPH - 16 como VPH - 18 durante 12 meses, los inventores estimaron que 500 mujeres por grupo de tratamiento proporcionarían un poder de 80% para evaluar un límite inferior del 95% de CI de la eficacia de vacuna por encima de cero. Los inventores asumían un 80% de tasa de retención durante 18 meses. Los análisis provisionales para eficacia, seguridad, e inmunogenicidad se hicieron para propósitos de planificación del estudio futuro solamente; el procedimiento de O'Brien y Fleming se usó para ajustar el valor para el análisis final después de que se produjeron los análisis provisionales (p global = 0,05; ensayo de dos vías). [PC O'Brien y TR Fleming, A multiple testing procedure for clinical trials. *Biometrics* 35 (1979), pp. 549 - 556]

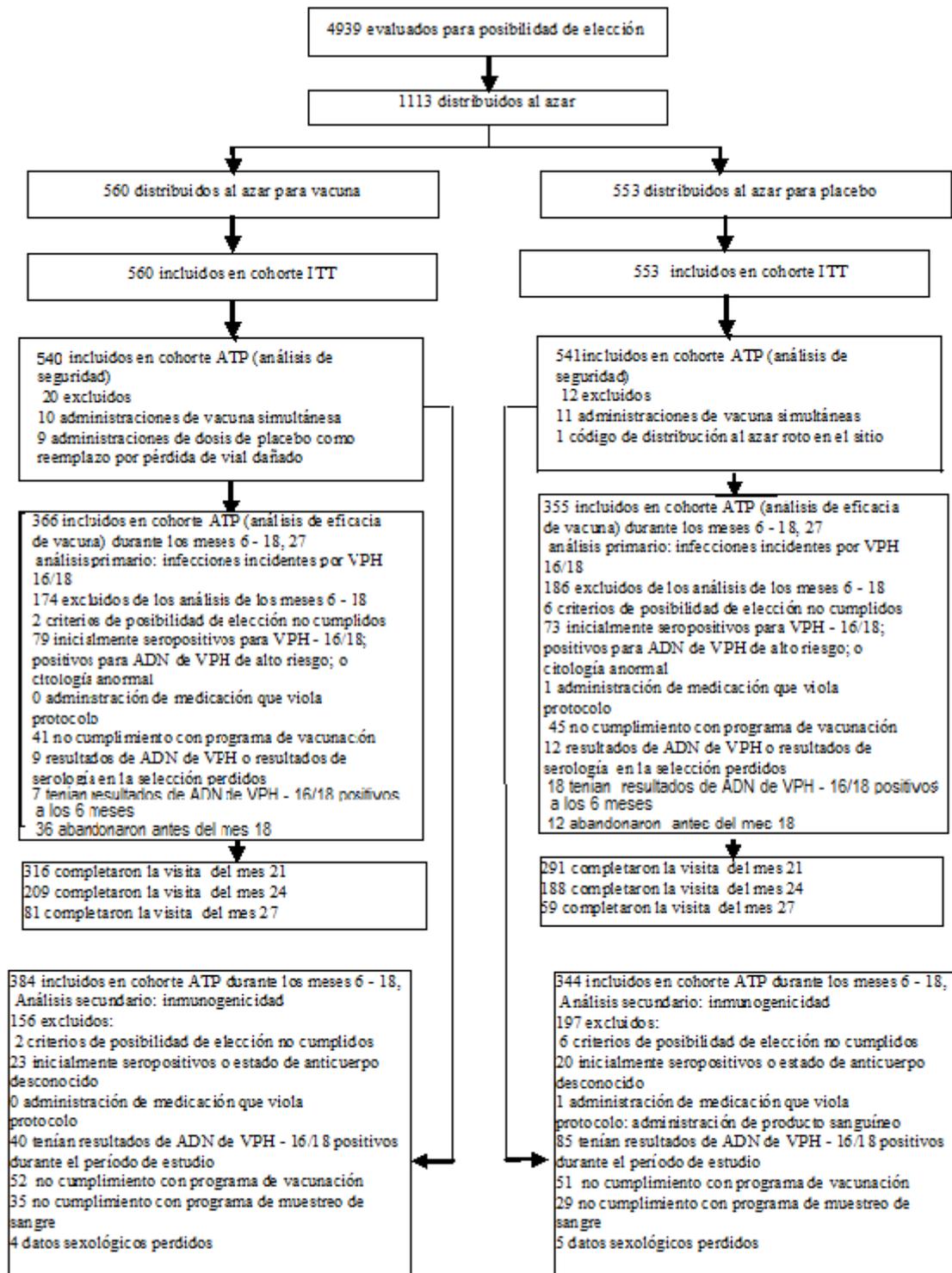
La distribución aleatoria estratificada, de bloque según algoritmos validados se centralizó con un sistema de distribución aleatoria de internet. La estratificación era según la edad (15 - 17, 18 - 21, y 22 - 25 años) y región (Norte América y Brasil). Cada dosis de vacuna se atribuyó a un número elegido al azar basándose en la información del participante específica medida en el sistema de distribución aleatoria computarizado por el personal del estudio. La localización del tratamiento permanece oculta para los investigadores y las mujeres participantes en un estudio de seguimiento a largo plazo.

Las cohortes de intención - de - tratar y según - el - protocolo se muestran en la figura, en las que las razones para la exclusión de los análisis se enumeran por orden de categoría mujeres que reunían más de un criterio de exclusión se contaron solamente según el criterio de categoría más alta. Los inventores se refieren a conjuntos de participantes introducidos en los análisis de intención - de - tratar y según - el - protocolo como cohortes, aunque la información usada para restringir la inclusión de sujetos en el según - el - protocolo solamente se conocía después del seguimiento.

Los inventores realizaron tanto según - el - protocolo como intención - de - tratar para eficacia. El cálculo de la eficacia de vacuna en el análisis según - el - protocolo se basó en la proporción de participantes con infección por VPH - 16/18 en los grupos vacunados frente placebo. La eficacia de vacuna se definió como 1 menos la relación entre estas dos proporciones; 95% de CI medía la precisión de las estimaciones de eficacia, los valores de p se calcularon con el ensayo exacto de Fisher de dos vías. Las tasas correspondientes se expresaron como el número de casos con el resultado dividido por el número de participantes en riesgo. La cohorte según - el - protocolo de 18 meses incluía las mujeres alistadas que recibieron tres dosis programadas de vacuna y cumplían con el protocolo como se describe en la figura.

El cálculo de la eficacia de vacuna en los análisis intención - de - tratar y según - el - protocolo de 27 meses se basaron en el modelo proporcional de Cox usando el tiempo de ocurrencia de los casos con infección por VPH 16/18 en los grupos vacunados frente placebo. Esto permitió el control para los datos acumulados de persona - tiempo. La eficacia de vacuna se calculó usando 1 menos la relación de azar y los valores de p calculados usando el ensayo de log de categoría. Las tasas correspondientes se expresaron como el número de casos divididos por el persona - tiempo total. Todas las mujeres alistadas que recibieron al menos una dosis de vacuna o placebo, eran negativos para VPH -ADN de alto riesgo el mes 0, y tenía cualquier dato disponible para la medición de resultados se incluyeron en la cohorte intención - de - tratar. La cohorte según - el - protocolo de 27 meses incluía los resultados de la cohorte según - el - protocolo de 18 meses y los resultados que se produjeron durante la fase de extensión (de los 18 meses a los 27 meses).

El cálculo de los valores de p para los análisis de seguridad se realizó usando las comparaciones del ensayo exacto de Fisher. La cohorte para los análisis de seguridad incluyeron todas las mujeres alistadas que recibieron al menos una dosis de vacuna o placebo y cumplían con los requerimientos de protocolo mínimos, especificados (véase la figura a continuación).



5 La inmunogenicidad se evaluó en un subconjunto de la cohorte de seguridad según el protocolo que incluía mujeres con resultados de serología en los meses 0, 7, y 18, que recibieron las tres dosis de vacuna o placebo del estudio según el programa, cumplieron con el programa de muestreo de sangre, y no llegaron a ser positivas para ADN de VPH - 16/18 durante el ensayo. Las tasas de seropositividad entre los grupos de vacuna y placebo se compararon con el ensayo exacto de Fisher ($p < 0,001$ juzgado significativamente). La media geométrica de los títulos se comparó con ANOVA y ensayo de Kruskal - Wallis.

Los análisis de distribución aleatoria en bloque y estadísticos se realizaron con SAS versión 8,2 (SAS Institute, Cary, North Carolina).

Resultados

Los resultados del análisis inicial sobre protección cruzada se presentan en al solicitud de patente WO 2004/056389, cuyo contenido total se incorpora en la presente memoria descriptiva por referencia.

5 Análisis adicional

Se llevó a cabo un análisis sobre un grupo "ATP" (según a protocolo) para aquellos pacientes que cumplían con todos los criterios del ensayo. En el grupo de ATP todos los pacientes recibieron 3 dosis de vacuna en los meses 0, 1 y 6 y eran seronegativos a los 6 meses.

10 Como se demuestra por los datos presentados en al tabla 4, la inmunización con una mezcla de las PLV de VPH 16 y VPH 18 proporcionó protección cruzada estadísticamente significativa contra infección incidente por los tipos de VPH 31, 52 y 45 comparados con el control.

La protección cruzada estadísticamente significativa infección incidente también se observó contra el grupo de todos los tipos relacionados con VPH 16 (VPH - 31, 33, 35, 52 y 58) y el grupo de todos los tipos de alto riesgo, excluyendo 16 y 18 (VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, y 68).

15 La protección cruzada estadísticamente significativa contra la infección persistente también se observó contra los tipos 31 y 52 (véase tabla 5), y también se observó contra el grupo de todos los tipos relacionados con VPH 16 (véase la tabla 5).

20 También se observó protección cruzada estadísticamente significativa contra anomalías citológicas asociadas a VPH 52, véase la tabla6. La protección estadísticamente significativa también se observó contra el grupo de todos los tipos relacionados con VPH 16 (VPH - 31, 33, 35, 52, y 58) y el grupo de todos los tipos de alto riesgo, excluyendo 16 y 18 (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, y 68).

Tabla 4

Eficacia contra infecciones incidentes con los tipos relacionados con 16/18 *

	Tipo VPH	Vacuna		Control		Eficacia de vacuna	
		N	AR	N	AR	%	Valor de P
relacionados con 16	VPH - 31	1	0,2	10	2,4	99,0	0,06
	VPH - 33	6	1,4	6	1,4	-0,2	1,000
	VPH - 35	1	0,2	3	0,7	66,5	0,624
	VPH - 52	6	1,4	16	3,9	63,0	0,031
	VPH - 58	5	1,2	5	1,2	0,0	1,000
relacionados con 18	VPH - 45	0	0,0	5	1,2	100,0	0,031
	VPH - 59	4	0,9	2	0,5	-100,5	0,448
Todos relacionados con 16		16	4,0	32	8,1	51,1	0,017
Todos relacionados con 18		4	1,0	7	1,7	43,0	0,384
Todos HR (excepto 16/18)		32	9,0	53	15,6	42,3	0,011

* Muestras de cuellos de útero: cohorte de ATP

Tabla 5

Eficacia contra infecciones persistentes con los tipos relacionados con 16/18 *

	Tipo VPH	Vacuna		Control		Eficacia de vacuna	
		N	AR	N	AR	%	Valor de P
relacionados con 16	VPH - 31	2	0,48	9	2,15	78,5	0,030
	VPH - 33	3	0,71	5	1,18	40,2	0,476
	VPH - 35	1	0,24	1	0,24	0,4	0,998
	VPH - 52	5	1,2	21	5,10	77,1	0,001
	VPH - 58	4	0,95	6	1,42	34,1	0,515
relacionados con 18	VPH - 45	1	0,24	4	0,94	75,4	0,174
	VPH - 59	3	0,71	0	0,00	-	0,083
	Todos relacionados con 16	11	2,7	30	7,6	65,1	0,002
	Todos relacionados con 18	4	1,0	4	1,0	1,0	0,989
	Todos HR (excepto 16/18)	36	10,1	46	13,5	27,1	0,155

5

* Todas las muestras; cohorte de ATP

Tabla 6

Eficacia contra anomalías citológicas. Con los tipos relacionados con 16/18 *

	Tipo VPH	Vacuna		Control		Eficacia de vacuna	
		N	AR	N	AR	%	Valor de P
relacionados con 16	VPH - 31	1	0,24	5	1,20	80,1	0,123
	VPH - 33	2	0,47	4	0,94	49,9	0,686
	VPH - 35	0	0,00	2	0,47	100	0,499
	VPH - 52	1	0,24	11	2,67	91	0,003
	VPH - 58	2	0,47	2	0,47	0,2	1,000
relacionados con 18	VPH - 45	0	0,00	2	0,47	100	0,249
	VPH - 59	4	0,94	2	0,47	101	0,451
Todos relacionados con 16		5	1,2	18	4,6	72,8	0,005
Todos relacionados con 18		4	1,0	4	1,0	0,2	1,000
Todos HR (excepto 16/18)		10	2,8	30	8,8	68,2	<0,001

5

*** Cohorte de ATP**

En las tablas 4, 5 y 6

N = número de sujetos en la cohorte específica

AR = tasa de ataque = n (número de sujetos con VPH o bien infección incidente, infección persistente o anomalía citológica, según sea apropiado para la tabla) / N

10

% de eficacia de vacuna es $1 - (A/B) \times 100$, ajustada para el tamaño relativo de grupo de vacuna y placebo, en la que

A = % de mujeres en el grupo de vacuna con infección incidente, infección persistente o anomalía citológica, según sea apropiado para la tabla

15

B = % de mujeres en el grupo de placebo con infección incidente, infección persistente o anomalía citológica, según sea apropiado para la tabla

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende las PLV o cápsomeros de VPH 16 y VPH 18 y al menos otro tipo de cáncer de VPH, siendo seleccionado el otro tipo de cáncer entre la lista que consisten en los tipos de VPH 31, 45 y 52, en la que la dosis de la PLV o capsómero de al menos otro tipo de cáncer se reduce con relación al del VPH 16 ó 18.
2. Una composición según la reivindicación 1 en la que el otro tipo de cáncer es VPH 31.
3. Una composición según la reivindicación 1 en la que el otro tipo de cáncer es VPH 45.
4. Una composición según la reivindicación 1 en al que el otro tipo de cáncer es VPH 52.
5. Una composición según la reivindicación 1 en la que los otros tipos de cánceres son VPH 31 y VPH 45.
- 10 6. Una composición según la reivindicación 1 en la que los otros tipos de cánceres son VPH 31 y VPH 52.
7. Una composición según la reivindicación 1 en la que los otros tipos de cánceres son VPH 52 y VPH 45.
8. Una composición según la reivindicación 1 en la que los otros tipos de cánceres son VPH 31, VPH 45 y VPH 52.
- 15 9. Una composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones preferentes en la que la composición comprende 10 µg, o más, de las PLV de VPH 16 y/o VPH 18 o capsómero y entre 2-9 µg de PLV o capsómero del otro tipo de cáncer.
10. Una composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la que la composición comprende 20 µg, o más, de las PLV de VPH 16 y/o VPH 18 o capsómeros y entre 5-15 µg de PLV o capsómero del otro tipo de cáncer.
- 20 11. Una composición inmunogénica según la reivindicación 10 en la que la composición comprende 10 µg de PLV o capsómero del otro tipo de cáncer.
12. Una composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en combinación con un adyuvante.
13. Una composición según la reivindicación 12 en la que el adyuvante es una sal de aluminio.
14. Una composición según la reivindicación 13 en la que el adyuvante es hidróxido de aluminio.
- 25 15. Una composición según la reivindicación 12 en la que el adyuvante es un derivado del lípido A.
16. Una composición según la reivindicación 15 en la que el adyuvante es 3D MPL.
17. Una composición según la reivindicación 16 en la que el adyuvante es 3D MPL e hidróxido de aluminio.
18. Una vacuna que comprende una composición inmunogénica según cualquier reivindicación precedente con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30