(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 528 665**

(51) Int. CI.:

A61K 39/295 (2006.01)
A61K 39/10 (2006.01)
A61K 39/05 (2006.01)
A61K 39/13 (2006.01)
A61K 39/08 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2007 E 07825522 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2073841**

(54) Título: **Fabricación de vacunas amplificadoras que tienen dosis de antígeno reducidas**

(30) Prioridad:

16.08.2006 GB 0616306

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2015

(73) Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

(72) Inventor/es:

DE HEYDER, KOENRAAD;
ARTOIS, CLAUDE y
VANDECASSERIE, CHRISTIAN

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

DESCRIPCIÓN

Fabricación de vacunas amplificadoras que tienen dosis de antígeno reducidas

Campo técnico

La presente invención pertenece al campo de la fabricación de vacunas de combinación, es decir vacunas que contienen inmunógenos mezclados de más de un patógeno, de tal forma que la administración de la vacuna puede inmunizar a un sujeto simultáneamente contra más de un patógeno.

Técnica antecedente

En 2005, se patentaron dos vacunas amplificadoras para adolescentes en EE.UU.: BOOSTRA™ y ADACEL™ [1]. Ambas vacunas contienen toxoide diftérico, toxoide tetánico y antígenos de pertussis acelular. Una característica común de estas dos vacunas es que, en relación con sus homólogos pediátricos, tienen menor dosis de antígeno, por ejemplo, el contenido en toxoide diftérico de BOOSTRIX™ es 10 veces menor que en los productos INFANRIX™, y en ADACEL™ es 7,5 veces menor que en DAPTACEL™. Por otra parte, también se altera la relación de componentes antigénicos. En particular, la relación de toxoides diftéricos y tetánicos es de 2,5 : 1 en los productos INFANRIX™, aunque es de 1 : 2 en el producto BOOSTRIX™, y es de 3 : 1 en el producto DAPTACEL™, aunque es de 1 : 2,5 en el producto ADACEL™.

Así pues, estas vacunas amplificadoras muestran una gran reducción en la dosis de toxoide diftérico, tanto en cantidades absolutas como también en relación con el contenido en toxoide tetánico.

Es un objeto de la invención proporcionar procedimientos adicionales y mejorados para la fabricación de composiciones de vacuna de este tipo.

Descripción detallada de la invención

en vez de fabricar composiciones de vacuna amplificadora mediante un procedimiento que implica mezclar antígenos individuales de la difteria y del tétanos, la invención usa (i) un primer volumen que comprende tanto toxoide diftérico como toxoide tetánico, y (ii) un segundo volumen que comprende toxoide tetánico sin toxoide diftérico. Esta disposición facilita la fabricación conveniente de ambas vacunas pediátricas y para adolescentes a partir de los mismos volúmenes: el primer volumen puede tener una relación difteria : tétanos que es adecuada para vacunas pediátricas, y el segundo volumen se puede usar para reducir la cantidad relativa de toxoide diftérico, como se encuentra en las vacunas para adolescentes.

Así pues, un solo volumen puede cumplir dos funciones para un fabricante de vacunas, lo que puede simplificar las cosas. Por ejemplo, se puede preparar un volumen mixto de difteria / tétanos y analizarlo para detectar los parámetros de liberación clínicos (esterilidad, potencia, contenido en antígenos, etc.) y después mantener en almacenamiento. Si se requiere una vacuna pediátrica, entonces se puede usar el volumen sin ajuste adicional de la relación de difteria / tétanos, pero si se requiere una vacuna para adolescentes entonces no hay que preparar materiales adicionales de difteria. El volumen de toxoide diftérico monovalente no se tiene que preparar, ni analizar, ni almacenar, simplificando de esta forma el procedimiento de fabricación. Con un volumen mezclado de difteria / tétanos en almacenamiento, el fabricante puede preparar fácilmente vacunas pediátricas; almacenando de forma adicional un volumen monovalente de toxoide tetánico para suplementar el volumen de difteria / tétanos, el fabricante puede cambiar fácilmente entre formulaciones pediátricas y para adolescentes sin la necesidad de un volumen monovalente de toxoide diftérico separado, por ejemplo, dependiendo de los cambios a demanda de los profesionales de la salud.

Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para la fabricación de una vacuna, en el que la vacuna comprende toxoide diftérico y toxoide tetánico y, en el que el procedimiento comprende las etapas de combinar (i) un primer volumen que comprende toxoide diftérico y toxoide tetánico con (ii) un segundo volumen que comprende toxoide tetánico, pero no toxoide diftérico.

La vacuna puede comprender antígenos adicionales, tales como antígenos de pertussis acelular, antígenos de poliovirus inactivados, etc. Estos antígenos adicionales se pueden usar en el procedimiento como volúmenes separados, y / o pueden estar presentes en el primer y / o segundo volumen en el inicio del procedimiento.

La vacuna puede comprender un adyuvante, tal como un adyuvante que comprende una o más sales de aluminio, por ejemplo, hidróxido de aluminio. Los adyuvantes se pueden usar en el procedimiento como volúmenes separados, y / o pueden estar presentes en el primer y / o segundo volumen antes del inicio del procedimiento.

El primer volumen acuoso

El primer volumen usado en los procedimientos de la invención comprende tanto toxoide diftérico como toxoide tetánico.

En el primer volumen los toxoides diftérico y tetánico son adsorbidos preferentemente (más preferentemente totalmente adsorbidos) en un adyuvante de hidróxido de aluminio. La adsorción se puede lograr mediante la preparación de los toxoides por separado, adsorbiendo cada de ellos por separado a un adyuvante de hidróxido de aluminio y, a continuación, mezclando los dos toxoides adsorbidos (opcionalmente con adyuvante adicional y cualquier otro componente deseado) para dar el primer volumen.

El primer volumen puede incluir un conservante, tal como 1-hidroxi-2-fenoxietano (también conocido como "2-hidroxietil fenil éter", "2-fenoxietanol", "etilenglicol fenil éter", etc.). Sin embargo, los volúmenes preferidos, están libres de conservantes, y, en particular, están libres de 1-hidroxi-2-fenoxietano. Sin embargo, si el primer volumen contiene 1-hidroxi-2-fenoxietano, su concentración está preferiblemente (a) entre 2,5 mg y 3,5 mg (por ejemplo aproximadamente 3 mg) por cada 100 Lf de toxoide diftérico, y / o (b) entre 7 mg y 8 mg (por ejemplo aproximadamente 7,5 mg) por cada 100 Lf de toxoide tetánico. En el primer volumen se puede usar una concentración de 1-hidroxi-2-fenoxietano de entre 3 g / l y 8 g / l (por ejemplo, entre 4 g / l - 6 g / l, o aproximadamente 5 g / l). El primer volumen está libre de conservantes mercuriales (por ejemplo timerosal).

La relación (medida en unidades Lf) de toxoide diftérico a toxoide tetánico en el primer componente es entre 2 : 1 y 3 : 1, y preferiblemente es de aproximadamente 2,5 : 1.

La concentración de toxoide diftérico y toxoide tetánico en el primer volumen puede ser como sigue, expresado por mililitros (±10%): 167 Lf de toxoide diftérico; y 67 Lf de toxoide tetánico. Como alternativa, las concentraciones de toxoides pueden ser fracciones de estos valores, siempre que las proporciones relativas (la relación) permanezcan iguales, por ejemplo como se puede obtener por dilución simple.

El primer volumen puede incluir compuestos adicionales, además de los toxoides, adyuvante y conservante opcional. En particular, puede comprender cloruro de sodio y / o el formaldehído residual. Se prefiere una concentración de cloruro sódico de entre 5 mg y 6 mg por 100 Lf de toxoide diftérico, por ejemplo, entre 8 mg / ml y 9 mg / ml (por ejemplo, aproximadamente 8,5 mg / ml).

El primer volumen está preferiblemente libre de polisorbato 80.

El segundo volumen acuoso

El segundo volumen usado en los procedimientos de la invención comprende toxoide tetánico, pero está libre de toxoide diftérico.

El toxoide tetánico en el segundo volumen puede ser adsorbido sobre un adyuvante de hidróxido de aluminio. Preferiblemente, sin embargo, el toxoide tetánico está libre de adyuvantes, y en particular está libre de sal (es) de aluminio. Si el toxoide tetánico en el segundo volumen es adsorbido a un adyuvante de hidróxido de aluminio, entonces un procedimiento de la invención puede implicar una etapa inicial de: preparación del segundo volumen mediante la combinación de una preparación de toxoide tetánico libre de aluminio con un adyuvante de hidróxido de aluminio. Antes de ser usado en un procedimiento de la invención, el adyuvante y el toxoide combinados se pueden dejar durante un período de tiempo para permitir la adsorción.

El segundo volumen puede incluir un conservante, tal como 1-hidroxi-2-fenoxietano. Sin embargo, los volúmenes preferidos están libres de conservantes, y, en particular, están libres de 1-hidroxi-2-fenoxietano. El segundo volumen es libre de conservantes mercuriales (por ejemplo timerosal).

El segundo volumen está preferentemente libre de polisorbato 80.

Toxoides diftéricos

La difteria está producida por Corynebacterium diphtheriae, una bacteria aeróbica Gram-positivo no formadora de esporas. Este organismo expresa una exotoxina de ADP-ribosilación codificada por profago ('toxina de la difteria'), que se puede tratar (por ejemplo, usando formaldehído) para dar un toxoide que ya no es tóxico pero que sigue siendo antigénico y es capaz de estimular la producción anticuerpos antitoxina específicos después de la inyección. Los toxoides diftéricos se desvelan con más detalle en el capítulo 13 de la referencia 2. Los toxoides diftéricos preferidos son los preparados por tratamiento con formaldehído. El toxoide diftérico se puede obtener por C. diphtheriae en cultivo en medio de cultivo (por ejemplo, medio Fenton, o medio Linggoud y Fenton), que se pueden suplementar con extracto bovino, seguido de tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material toxoide se puede entonces tratar por medio de un procedimiento que comprende filtración y / o diálisis estéril.

Las cantidades de toxoide diftérico se pueden expresar en unidades internacionales (UI). Por ejemplo, el NIBSC proporciona la “Diphtheria Toxoid Adsorbed Third International Standard 1999” [4, 5] que contiene 160 UI por ampolla. Como una alternativa al sistema UI, la unidad “Lf” ("unidades floculantes" o la "dosis floculante de cales", o “límite de floculación”) se define como la cantidad de toxoide que, cuando se mezcla con una Unidad Internacional de antitoxina, produce una mezcla floculante óptima [6]. Por ejemplo, el NIBSC suministra el “Diphtheria Toxoid, Plain” [7], que contiene 300 Lf por ampolla, y también suministra “The 1st International Reference Reagent For Diphtheria Toxoid For Flocculation Test” [8] que contiene 900 Lf por ampolla. La conversión entre sistems UI y Lf depende de la preparación toxoide particular.

Cuando se usen materiales de origen bovino en el cultivo de C. diphtheriae, se deben obtener de fuentes que estén libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB) o de otras encefalopatías espongiformes transmisibles (EET).

Toxoides tetánicos

El tétanos está producido por la bacteria Clostridium tetani, un bacilo formador de esporas Gram-positivo. Este organismo expresa una endopeptidasa (“toxina del tétanos”), que se puede tratar para dar un toxoide que ya no es tóxico pero que sigue siendo antigénico y es capaz de estimular la producción de anticuerpos antitoxina específicos después de la inyección. Los toxoides tetánicos se desvelan con más detalle en el capítulo 27 de la referencia 2. Los toxoides tetánicos preferidos son los preparados por medio de tratamiento con formaldehído. El toxoide tetánico se puede obtener mediante C. tetani en cultivo en medio de cultivo (por ejemplo, un medio Latham derivado de caseína bovina), seguido por tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. Después, el material se puede tratar por medio de un procedimiento que comprende filtración y / o diálisis estéril.

Las cantidades de toxoide tetánico se pueden expresar en unidades internacionales (UI). Por ejemplo, el NIBSC [9] proporciona la “Tetanus Toxoid Adsorbed Third International Standard 2000” [10, 11], que contiene 469 UI por ampolla. Como una alternativa al sistema UI, la unidad 'Lf' se define como la cantidad de toxoide que, cuando se mezcla con una Unidad Internacional de antitoxina, produce una mezcla floculante óptima [12]. Por ejemplo, el NIBSC proporciona “The 1st International Reference Reagent for Tetanus Toxoid For Flocculation Test” [13] que contiene 1000 Lf por ampolla. La conversión entre los sistemas de UI y Lf depende de la preparación de toxoide particular.

Cuando se usan materiales de origen bovino en el cultivo de C. tetani, se deben obtener de fuentes que están libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB) o de otras encefalopatías espongiformes transmisibles (EET).

Antígenos de pertussis acelular

La Bordetella pertussis es una bacteria aeróbica Gram-negativo no formadora de esporas que causa la tos ferina. Como se ha descrito en más detalle en el capítulo 21 de la referencia 2, las vacunas contra B. pertussis están disponibles desde hace muchos años, y se dividen en dos categorías: celulares y acelulares. Las vacunas celulares comprenden células de B. pertussis enteras que han sido matadas y desactivadas (por ejemplo, por tratamiento con formalina y / o calor), mientras que las vacunas acelulares comprenden antígenos específicos purificados de B. pertussis, ya sean purificados a partir de la bacteria nativa o purificados después de la expresión en un huésped recombinante.

Los procedimientos de la invención pueden implicar el uso de antígenos de pertussis acelular con el fin de proporcionar vacunas que comprenden toxoide diftérico, toxoide tetánico y antígenos de pertussis acelular.

La invención usará típicamente más de un antígeno de pertussis acelular (aP) en una sola vacuna, por ejemplo, dos o tres de los siguientes antígenos de B. pertussis bien conocidos y bien caracterizados: (1) toxina de pertussis detoxificada (toxoide pertussis, o 'PT'); (2) hemaglutinina filamentosa ("FHA"); (3) pertactina (también conocida como la “proteína de la membrana exterior de 69 kiloDalton”). Lo más preferido es que se usen estos tres antígenos. Estos tres antígenos se preparan preferiblemente por el aislamiento a partir del cultivo de B. pertussis cultivada en medio líquido Stainer-Scholte modificado. PT y FHA se pueden aislar a partir del caldo de fermentación (por ejemplo, por adsorción en gel de hidroxiapatita), mientras que la pertactina se pueden extraer de las células por tratamiento térmico y floculación (por ejemplo, usando cloruro de bario). Los antígenos pueden ser purificados en etapas cromatográficas sucesivas y / o de precipitación. PT y FHA pueden ser purificados por cromatografía hidrofóbica, cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño. La pertactina puede purificarse por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica y cromatografía de exclusión por tamaño.

FHA y pertactina se pueden tratar con formaldehído antes de usar de acuerdo con la invención. PT se detoxifica preferiblemente mediante tratamiento con formaldehído y / o glutaraldehído. Como una alternativa a este procedimiento de detoxificación química PT puede ser un mutante de PT en el que se ha reducido la actividad enzimática mediante mutagénesis [14], pero se prefiere la detoxificación por tratamiento químico.

Otros antígenos de pertussis acelulares que se pueden usar incluyen fimbrias (por ejemplo, aglutinógenos 2 y 3).

El (Los) antígeno (s) aP se puede (n) usar en un estado no adsorbido, pero se adsorben preferentemente sobre uno o más adyuvante (s) de sal de aluminio antes de usarse. Los antígenos AP son adsorbidos preferentemente sobre un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Los antígenos AP se pueden añadir al primer y / o segundo volumen (es), o se pueden añadir en forma de un volumen separado. Cuando se usa más de un antígeno aP, cada antígeno AP se puede añadir en forma de su propio volumen, o se pueden combinar antígenos AP en el mismo volumen antes de usar.

Preferiblemente, los componentes AP están sustancialmente libres de 1-hidroxi-2-fenoxietano.

Preferiblemente, los componentes AP están sustancialmente libres de conservantes mercuriales (por ejemplo timerosal).

El (Los) componente (s) aP pueden incluir polisorbato 80. El nivel de polisorbato 80 en el (los) componente (s) de pertussis es tal que, después de cualquier dilución del componente para garantizar que los antígenos de pertussis están a la concentración deseada en el producto de vacuna final, la concentración de polisorbato 80 es inferior a 200 µg / ml, y es preferiblemente menor que 100 µg / ml. Una concentración de polisorbato típica en el producto de vacuna final está de entre 70 y 90 µg / ml, por ejemplo, aproximadamente 80 µg / ml.

Un límite superior preferido de la cantidad de polisorbato 80 en un componente aP antes de su uso en el procedimiento de la invención es <40 µg por 10 µg de FHA.

Las cantidades de antígenos de pertussis acelular se expresan normalmente en microgramos. Para una combinación de PT, FHA y pertactina, las cantidades de cada antígeno se seleccionan preferiblemente para dar una relación en peso final PT : FHA : pertactina en la vacuna final de 8 : 8 : 2,5.

Antígenos de poliovirus inactivados

La poliomielitis puede ser producida por uno de los tres tipos de poliovirus. Los tres tipos son similares y producen síntomas idénticos, pero son antigénicamente muy diferentes y la infección por un tipo no protege contra la infección por otros. Como se ha explicado en el capítulo 24 de la referencia 2, por lo tanto, se prefiere el uso de tres antígenos de poliovirus en el procedimiento de la invención: poliovirus tipo 1 (por ejemplo, cepa Mahoney), poliovirus tipo 2 (por ejemplo, cepa MEF-1), y poliovirus tipo 3 (por ejemplo, cepa Saukett).

Los procedimientos de la invención pueden implicar el uso de antígenos de poliovirus inactivados (abreviadamente en inglés IPV) con el fin de proporcionar vacunas que comprenden toxoide diftérico, toxoide tetánico y antígenos de poliovirus inactivados.

Los poliovirus se pueden cultivar en cultivo celular. Un cultivo preferido usa una línea celular Vero, que es una línea celular continua derivada de riñón de mono. Las células Vero se pueden cultivar de forma conveniente en microvehículos. El cultivo de las células Vero antes y durante la infección viral puede implicar el uso de material de origen bovino, tal como suero de ternera, y de hidrolizado de lactoalbúmina (por ejemplo, obtenido por degradación enzimática de lactoalbúmina). Dicho material de origen bovino se debe obtener de fuentes que están libres de EEB u otra EET. Después del cultivo, los viriones se pueden purificar usando técnicas tales como ultrafiltración, diafiltración y cromatografía. Antes de la administración a los pacientes, los poliovirus deben ser inactivados, y esto se puede conseguir mediante tratamiento con formaldehído antes de que los virus se usen en el procedimiento de la invención.

Los tres poliovirus preferentemente se cultivan, purifican e inactivan por separado, y luego se combinan para dar una mezcla a granel para su uso en el procedimiento de la invención. Los poliovirus combinados preferiblemente no se adsorben a cualquier adyuvante antes de usarse en el procedimiento de la invención, pero después de la adición pueden llegar a ser adsorbidos sobre adyuvante (s) de aluminio ya presente (s) en la composición de vacuna.

Los antígenos de IPV pueden ser añadidos al primer y / o segundo volumen (es), o pueden ser añadidos en forma de un volumen independiente.

Preferiblemente, los antígenos de IPV están sustancialmente libres de 1-hidroxi-2-fenoxietano.

Preferiblemente, los antígenos de IPV están sustancialmente libres de conservantes mercuriales (por ejemplo timerosal).

Preferiblemente, los antígenos de IPV están sustancialmente libre de polisorbato 80, por ejemplo, contienen menos de 0,1 µg / ml de polisorbato 80, y preferiblemente no contienen polisorbato 80 detectable. Sin embargo, el Polisorbato 80 se puede haber usado durante la producción de un componente de IPV.

Los antígenos de IPV pueden contener pequeñas cantidades de neomicina y / o polimixina.

Las cantidades de antígenos de IPV se expresan normalmente en la unidad "DU" (la "unidad de antígeno D" [15]). Las cantidades de antígeno para cada cepa por separado se seleccionan preferiblemente para dar un tipo de relación DU de 1 : 2 : 3 en la vacuna final de 5 : 1 : 4.

Antígenos adicionales opcionales

La invención se usa preferentemente para preparar vacunas trivalentes contra la difteria - tétanos - tos ferina o para preparar vacunas tetravalentes contra la difteria – tétanos - tos ferina - poliovirus. Sin embargo, además de los antígenos de difteria, tétanos, tos ferina e IPV, las vacunas de la invención pueden incluir uno o más antígenos adicionales, por ejemplo, del virus de la hepatitis B, de Haemophilus influenzae B, de Streptococcus pneumoniae, de Neisseria meningitidis, virus de la hepatitis A, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubéola, rotavirus, virus de la gripe, etc.

Adyuvantes

Como se describió anteriormente, los antígenos pueden ser adsorbidos a adyuvantes de aluminio antes de ser usados en el procedimiento de la invención (son “pre-adsorbidos”).

Los adyuvantes de aluminio actualmente en uso se denominan típicamente adyuvantes de "hidróxido de aluminio" o "fosfato de aluminio". Sin embargo, estas denominaciones son de conveniencia, ya que ninguna es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 16). La invención puede usar cualquiera de los adyuvantes "hidróxido" o "fosfato" que son de uso general en forma de adyuvantes.

Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que son por lo general al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que se puede representar por la fórmula AlO (OH), se puede distinguir de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio Al (OH)3, por espectroscopia infrarroja (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción a 1070 cm-1 y un respaldo fuerte a 3090 cm-1 – 3100 cm-1 [capítulo 9 de la ref. 16]. El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por la anchura de la banda de difracción a media altura (WHH), con partículas escasamente cristalinas que muestran una mayor ampliación de la línea debido a los tamaños de cristalitos pequeños. El área de superficie aumenta a medida que aumenta la WHH y se ha visto que los adyuvantes con valores WHH más altos tienen mayor capacidad para la adsorción de antígenos. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se ve en micrografías electrónicas de transmisión) es típica de adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pH de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es típicamente de aproximadamente 11, es decir, el adyuvante en sí tiene una carga superficial positiva en pH fisiológico. Se han reseñado capacidades de adsorción de entre 1,8 mg – 2,6 mg de proteína por mg de Al +++ a pH 7,4 para los adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente hidroxifosfatos de aluminio, que contienen también a menudo una pequeña cantidad de sulfato. Se pueden obtener por precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución del fosfato por hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos por lo general tienen una relación molar PO4 / Al entre 0,3 y 0,99. Los hidroxifosfatos se pueden distinguir de AlPO4 estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro IR a 3164 cm-1 (por ejemplo, cuando se calienta a 200°C) indica la presencia de hidroxilos estructurales [capítulo 9 de la ref. 16].

La relación molar PO4 / Al3+ de un adyuvante de fosfato de aluminio estará por lo general entre 0,3 y 1,2, preferiblemente entre 0,8 y 1,2, y más preferiblemente 0,95 ± 0,1. El fosfato de aluminio será por lo general amorfo, en particular por las sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar PO4 / Al entre 0,84 y 0,92, incluido en 0,6 mg de Al3+ / ml. El fosfato de aluminio estará generalmente en forma de partículas (por ejemplo, morfología de placa, como se observa en micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5 µm – 20 µm (por ejemplo, aproximadamente 5 µm - 10 µm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han reseñado capacidades de adsorción de entre 0,7 mg a 1,5 mg de proteína por mg de Al +++ a pH 7,4 para adyuvantes de fosfato de aluminio.

El punto de carga cero (abreviadamente en inglés, PZC) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y concentración de los reactivos usados para preparar la sal por precipitación. El PZC

también se altera por el cambio de la concentración de iones libres de fosfato en solución (más fosfato = PZC más ácido) o mediante la adición de un tampón tal como un tampón de histidina (hace el PZC más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención tendrán por lo general un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferiblemente entre 5,0 y 6,5, por ejemplo, aproximadamente 5,7.

Las vacunas de la invención pueden tener un adyuvante de hidróxido de aluminio, o pueden tener un adyuvante combinado de hidróxido de aluminio / fosfato de aluminio. Cuando están presentes tanto una sal de hidróxido como una sal de fosfato, la relación de contenido de Al3+ proporcionado para cada una es preferiblemente 3 : 2 (por ejemplo, 0,6 mg / ml de Al3+ de hidróxido de aluminio, y 0,4 mg / ml de Al3+ de fosfato de aluminio).

El contenido de Al3+ de vacunas amplificadoras para adolescentes puede ser importante para la inmunidad óptima [17]. El contenido total de aluminio de una vacuna producida por la invención (medido por Al3+) es preferiblemente más de 0,25 mg / ml, pero es preferiblemente menos de 1,5 mg / ml, por ejemplo, es aproximadamente 0,6 mg / ml.

Para dar un contenido final de Al3+ deseado, es posible usar un contenido apropiado de Al3+ de volúmenes antes de combinarse y / o añadir sal (es) de aluminio extra, en forma de un volumen independiente, como por ejemplo combinar el primer volumen, el segundo volumen y un tercer volumen, en el que el tercer volumen contiene adyuvante (s) de aluminio.

Vacunas producidas por los procedimientos de la invención

En un uso normal, se usarán los procedimientos de la invención para proporcionar una vacuna de combinación a granel que es adecuada para envasado y, después, para distribución y administración. Las concentraciones mencionadas anteriormente son concentraciones típicamente en vacuna envasada final, y de esta forma, las concentraciones en la vacuna a granel pueden ser mayores (por ejemplo, para ser reducidas a concentraciones finales por dilución).

Los procedimientos de la invención pueden, por lo tanto, comprender la etapa adicional de envasado de la vacuna en recipientes para su uso. Los recipientes pueden incluir una sola dosis de vacuna, o pueden incluir más de una dosis (un recipiente 'multidosis') por ejemplo 10 dosis. Cuando se usa un vial multidosis, cada dosis debe ser retirada con una jeringa y una aguja estéril bajo estrictas condiciones asépticas, teniendo cuidado de evitar contaminar el contenido del vial. Se prefieren recipientes de dosis individuales. Los envases de dosis individuales múltiples se pueden envasar juntos por ejemplo, 10 viales de una sola dosis.

Los recipientes adecuados incluyen viales y jeringuillas desechables. Estos son preferiblemente estériles. Particularmente se prefiere el envasado en jeringas, de tal manera que la vacuna está lista para la administración por un usuario final. Las jeringas pueden ser distribuidas con una aguja unida, pero también es posible distribuirlas sin aguja.

Las jeringas pueden estar provistas de etiquetas despegables sobre las que se puede imprimir el número de lote y fecha de caducidad del contenido (por ejemplo, en forma de código de barras), para facilitar el mantenimiento del registro. Una jeringa puede incluir una banda de color (por ejemplo, verde) para facilitar la identificación de su contenido. El émbolo de la jeringa tiene preferiblemente un tapón para evitar que el émbolo se retire accidentalmente durante la aspiración. Las jeringuillas pueden tener una tapa y / o émbolo de goma látex. Por lo general, la jeringa tendrá una tapa en la punta para sellar la punta antes de la fijación de una aguja, y la tapa de la punta está hecha preferiblemente de caucho de butilo. Si la jeringa y la aguja se envasan por separado, entonces la aguja estará equipada preferiblemente con una protección de caucho de butilo. Se prefiere el caucho de butilo gris. La jeringa puede tener una punta que incorpora un mecanismo de bloqueo para asegurar una aguja, por ejemplo, un Luer- Lok ™. Las jeringas adecuadas son aquellas comercializadas bajo el nombre comercial Tip-Lok™ o Hypak™ PRTC.

Cuando la vacuna se envasa en viales, éstos pueden estar hechos de un material plástico o, preferiblemente, de vidrio. El vial se esteriliza preferiblemente antes de añadir la vacuna al mismo. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales se sellan preferiblemente con un tapón libre de látex.

Después de colocar la vacuna en un recipiente, el recipiente se puede encerrar después dentro de una caja para su distribución, por ejemplo, dentro de una caja de cartón. La caja será etiquetada con los detalles de la vacuna, por ejemplo, su nombre comercial, una lista de los antígenos en la vacuna (por ejemplo, “vacuna para toxoide tetánico, toxoide diftérico reducido y pertussis acelular, adsorbida" y / o "Tdap"), el envase de presentación (por ejemplo, "Jeringas precargadas desechables Tip-Lok” o “Viales de dosis individuales 10 x 0,5 ml"), su dosis (por ejemplo, “cada una contiene una sola dosis de 0,5 ml”), advertencias (por ejemplo, “Sólo uso para adolescentes”), una fecha de caducidad, el nombre del fabricante, etc. Cada caja puede contener más de una vacuna envasada, por ejemplo, cinco o diez vacunas envasadas, tal como cinco jeringas o diez viales. Para el efecto visual, el color de fondo de una

de las esquinas de la caja puede ser de un color diferente del resto de la caja, por ejemplo, una esquina púrpura en una caja verde.

La vacuna se podrá envasar (por ejemplo, en la misma caja) junto con un folleto que incluya los detalles de la vacuna, por ejemplo, instrucciones para la administración, detalles de los antígenos en la vacuna, etc. Las instrucciones también pueden contener advertencias, como por ejemplo, para mantener una solución de adrenalina fácilmente disponible en caso de reacción anafiláctica después de la vacunación, etc.

Los procedimientos de la invención son particularmente útiles para la preparación de vacunas con el siguiente contenido por mililitro:

Antígeno	Concentración por ml *
Toxoide diftérico	5 Lf
Toxoide tetánico	10 Lf
Toxina pertussis inactivada	16 µg
Hemaglutinina filamentosa	16 µg
Pertactina	5 µg
Poliovirus tipo 1 **	80 DU
Poliovirus tipo 2 **	16 DU
Poliovirus tipo 3 **	64 DU
* Estas dosis se dan al ± 10% ** en una vacuna tetravalente D-T-aP-IPV	

La concentración de antígenos individuales en la vacuna a granel, las diluciones requeridas antes de la adición de antígenos a la vacuna a granel, y cualquier dilución requerida desde la vacuna a granel hasta la final se pueden calcular en consecuencia, y de este modo el procedimiento de la invención se puede realizar para producir una vacuna de combinación final que contiene antígenos a estas concentraciones por dosis.

La vacuna final es preferiblemente estéril.

La vacuna final es preferiblemente no pirógena, por ejemplo, contiene <1 UE (unidad de endotoxina; 1 UE es igual a 0,2 ng, referencia convencional de la FDA , endotoxina EC-2 'RSE') por dosis, y preferiblemente <0,1 UE por dosis.

La vacuna final está preferiblemente libre de gluten.

El pH de la vacuna final está preferiblemente entre 6 y 8, por ejemplo, entre 6,5 y 7,5. Por lo tanto, un procedimiento de la invención puede incluir una etapa para ajustar el pH de la vacuna a granel antes del envasado.

La vacuna envasada es preferiblemente una suspensión blanca turbia.

La vacuna envasada se almacena preferiblemente entre 2°C y 8°C. No debe congelarse.

Para controlar la tonicidad del producto de vacuna final, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro de sodio (NaCl), tal como cloruro de sodio isotónico. Por lo general, es adecuada una concentración final de NaCl de 9 mg / ml.

Se prefiere no usar conservantes, y en particular conservantes mercuriales (por ejemplo timerosal) durante el procedimiento de la invención.

Administración de las vacunas

Las vacunas de combinación producidas por los procedimientos de la invención se administran preferiblemente a los pacientes por inyección. Se prefiere la inyección intramuscular (por ejemplo, en el músculo deltoides del brazo superior). Antes de la inyección, la piel en el sitio de la inyección debe limpiarse y prepararse de forma ideal con un germicida adecuado. Una inyección típica tendrá un volumen de 0,5 ml, y así un procedimiento de la invención puede comprender una etapa de extracción y envasado de una muestra de 0,5 ml de una vacuna de combinación a granel en un recipiente. El tamaño típico de la aguja para la administración de la vacuna BOOSTRIX es una aguja de calibre 22 - 25, entre 1 y 1,25 pulgadas de largo (2,5 a 3,2 cm).

Cuando una vacuna contiene un adyuvante de sal de aluminio, se debe agitar enérgicamente para obtener una suspensión homogénea, turbia, blanca antes de la administración.

La vacuna se administra de forma ideal en forma de una vacuna amplificadora a un paciente que ha sido previamente vacunado contra la difteria y el tétanos, y preferentemente también contra la tos ferina. Estos pacientes se pueden distinguir de la población general por tener una respuesta de memoria inmunológica contra la vacuna anterior. Los pacientes preferidos recibieron sus vacunas más recientes contra la difteria y / o tétanos al menos cinco años antes de recibir la vacuna de la invención. Los pacientes preferidos que reciben las vacunas tienen, pues, edades comprendidas entre los 4 y los 65 años de edad, por ejemplo 11 - 64 años, 10 - 18 años, etc.

Las vacunas producidas por la invención se pueden administrar a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo que otras vacunas (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un centro de vacunación o de atención médica profesional), por ejemplo sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna meningocócica conjugada (tal como una vacuna tetravalente del serogrupo AC-W135-Y) y / o una vacuna neumocócica conjugada multivalente, etc. Tales vacunas adicionales deben aplicarse con jeringas separadas y en sitios diferentes de inyección de las vacunas de la invención. Las vacunas pueden ser administradas de manera similar sustancialmente al mismo tiempo que la inmunoglobulina del tétanos.

Para cualquier antígeno particular, las directrices de vacunación (por ejemplo, directrices de la OMS) pueden recomendar o prescribir una cantidad que debe estar presente en una vacuna final. Esa información (por ejemplo, 10 µg por dosis) se puede combinar con el volumen de una dosis de vacuna (por ejemplo, una dosis de 0,5 ml) para calcular la concentración requerida en la vacuna a granel para ese antígeno.

Los procedimientos de la invención son particularmente útiles para la preparación de vacunas con el siguiente contenido por 0,5 ml de dosis:

Antígeno	Concentración por dosis *
Toxoide diftérico	2,5 Lf
Toxoide tetánico	5 Lf
Toxina pertussis inactivada	8 µg
Hemaglutinina filamentosa	8 µg
Pertactina	2,5 µg
Poliovirus tipo 1 **	40 DU
Poliovirus tipo 2 **	8 DU
Poliovirus tipo 3 **	32 DU
* Estas dosis se dan al ± 10% ** en una vacuna tetravalente D-T-aP-IPV	

General

El término "que comprende" abarca "que incluye", así como "que está constituido por" por, ejemplo, una composición "que comprende" X puede estar constituida por exclusivamente X o puede incluir, por ejemplo X + Y adicional.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y, puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, X±10%.

Cuando se usa un recipiente de vidrio, se prefiere un vidrio de borosilicato a un vidrio sódico - cálcico.

Cuando un componente se describe como que está "adsorbido" a un adyuvante, se prefiere que al menos el 50% (en peso) de ese antígeno esté adsorbido por ejemplo, el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o más. Si un componente está totalmente adsorbido, entonces ninguno debe ser detectable en el sobrenadante de una composición después de la centrifugación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la preparación de un volumen mezclado de toxoides diftérico y tetánico adsorbidos.

Ejemplo

Ejemplo 1: Vacuna D-T-aP para su uso como refuerzo para adolescentes

Se preparó un primer componente antígeno a granel como se muestra en la Figura 1. Tiene la siguiente composición:

Componente	Concentración por ml *
Toxoide diftérico	167 Lf
Toxoide tetánico	67 Lf
Adyuvante de hidróxido de aluminio	6,91 mg
1-hidroxi-2-fenoxietano	5 mg
Cloruro de sodio	8,5 mg
pH	Entre 6,0 y 6,3
* Estas dosis se dan al ± 10%	

Los toxoides diftérico y tetánico fueron ambos totalmente adsorbidos al adyuvante, siendo ninguno detectable en el sobrenadante después de la centrifugación de una muestra del volumen.

Este volumen se puede usar para preparar vacunas D-T-aP pediátricas, por ejemplo, que contienen 25 Lf de toxoide diftérico y 10 Lf de toxoide tetánico por dosis. Sin embargo, este volumen no se puede usar para una dosis de refuerzo para adolescentes que requiere más toxoide tetánico que toxoide diftérico (medido en unidades Lf). Si el volumen se diluye hasta una dosis de toxoide diftérico final deseada de 2,5 Lf, entonces la dosis de toxoide tetánico diluida será de sólo 1 Lf, que es 5 veces menor que la deseada. La dosis diluida de Al3+ (<0,1 mg) también será menor que la dosis mínima efectiva reseñada en la referencia 17. Por lo tanto, la relación difteria: tétanos y la dosis Al3+ tienen que ser modificadas.

Para permitir el ajuste de la relación difteria: tétanos, se preparó un segundo volumen que incluye toxoide tetánico concentrado (entre 3.000 Lf / ml y 3.000 Lf / ml; cloruro de sodio entre 8 mg / ml y 9 mg / ml; pH entre 7,0 y 7,8). El segundo volumen no tiene otros antígenos, ni adyuvantes ni conservantes.

Estos dos volúmenes de antígenos se combinan y se diluyen, junto con los volúmenes que incluyen adyuvantes de aluminio adicionales (hidróxido y fosfato), antígenos de pertussis acelular adsorbidos a adyuvante de hidróxido de aluminio, y cloruro de sodio, para dar una vacuna de combinación a granel con las concentraciones y relaciones de componentes finales deseadas. Este procedimiento puede ser usado para preparar un volumen con la siguiente composición por ml:

Componente	Cantidad por ml *
Toxoide diftérico	5 Lf
Toxoide tetánico	10 Lf
Toxina de pertussis inactivada	16 µg
Hemaglutinina filamentosa	16 µg
Pertactina	5 µg
Al3+	1 mg 0,6 mg de hidróxido de aluminio 0,4 mg de fosfato de aluminio

Este volumen se envasa en dosis de 0,5 ml en jeringas Tip-Lok ™. Esta vacuna se puede usar en forma de refuerzo en adolescentes que previamente recibieron vacunas D-T-P.

Así pues, el primer volumen se puede usar como base de ambas vacunas D-T-P pediátricas y para adolescentes.

Ejemplo 2: Vacuna DT-aP reducida en aluminio sin conservantes

Para eliminar el conservante en la vacuna preparada en el ejemplo 1, se usa un primer volumen diferente. No se añade 1-hidroxi- 2-fenoxietano durante la etapa de mezcla.

Con el fin de reducir el contenido en aluminio, no se añade ningún adyuvante de fosfato de aluminio.

Después del envasado, cada dosis de 0,5 ml libre de conservantes tiene la siguiente composición:

Componente	Cantidad por dosis *
Toxoide diftérico	2,5 Lf
Toxoide tetánico	5 Lf
Toxina de pertussis inactivada	8 µg
Hemaglutinina filamentosa	8 µg
Pertactina	2,5 µg
Cloruro de sodio	4,5 mg
Al3+	0,3 mg
* Estas dosis se dan al ± 10%	

Ejemplo 3: Vacuna D-T-aP-IPV

Para realizar una vacuna D-T-aP-IPV tetravalente, se añade IPV a granel mezclado al procedimiento del ejemplo 1, para dar una vacuna final con el siguiente contenido por dosis de 0,5 ml:

Componente	Cantidad por dosis *
Toxoide diftérico	2,5 Lf
Toxoide tetánico	5 Lf
Toxina de pertussis inactivada	8 µg
Hemaglutinina filamentosa	8 µg
Pertactina	2,5 µg
Poliovirus tipo 1 (Mahoney)	40 DU
Poliovirus tipo 2 (MEF1)	8 DU
Poliovirus tipo 3 (Saukett)	32 DU
Al3+	0,5 mg 0,3 mg de hidróxido de aluminio 0,2 mg de fosfato de aluminio
* Estas dosis se dan al ± 10%	

Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y se podrán realizar modificaciones mientras permanezcan dentro del ámbito y espíritu de la invención.

REFERENCIAS (cuyo contenido se incorpora como referencia en la presente memoria descriptiva)

[1] Broder et al. (2006) MMWR Recomm Rep 55(RR-3):1 - 34.

[2] Vaccines. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.

[3] National Institute for Biological Standards and Control; Potters Bar, UK. www.nibsc.ac.uk

[4] Sesardic et al. (2001) Biologicals 29:107 - 22.

[5] NIBSC code: 98/560

[6] Module 1 of WHO's The immunological basis for immunization series (Galazka).

[7] NIBSC code: 69/017.

[8] NIBSC code: DIFT.

[9] National Institute for Biological Standards and Control; Potters Bar, UK. www.nibsc.ac.uk

[10] Sesardic et al. (2002) Biologicals 30: 49 - 68.

[11] NIBSC code: 98/552.

[12] Module 1 of WHO's The immunological basis for immunization series (Galazka).

[13] NIBSC code: TEFT.

[14] Rappuoli et al. (1991) TIBTECH 9: 232 - 238

[15] Module 6 of WHO's The immunological basis for inmmunization series (Robertson)

[16] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).

[17] Theeten e al. (2005) Vaccine 23: 1515 - 21.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de una vacuna, en el que la vacuna comprende toxoide diftérico y toxoide tetánico, y en el que el procedimiento comprende las etapas de combinar (i) un primer volumen que comprende toxoide diftérico y toxoide tetánico a una relación de difteria: tétanos entre 2 : 1 y 3 : 1 (medida en unidades Lf) con (ii) un segundo volumen que comprende toxoide tetánico pero no toxoide diftérico.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la vacuna comprende también uno o más antígenos de pertussis acelular, por ejemplo, que incluye toxina de pertussis inactivada, hemaglutinina filamentosa y pertactina.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la toxina pertussis inactivada, hemaglutinina filamentosa y pertactina están presentes a una relación de 8 : 8 : 3 (medido en peso).

4. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la vacuna comprende también antígenos de poliovirus inactivado (IPV) por ejemplo, antígenos de IPV de cada de una cepa de poliovirus tipo 1, una cepa de poliovirus tipo 2 y una cepa de poliovirus tipo 3.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que los antígenos de IPV están presentes a una relación Tipo 1 : 2 : 3 de 5 : 1 : 4 (medido por DU).

6. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la vacuna comprende uno o más adyuvantes de sales de aluminio, por ejemplo, en el que la vacuna comprende un adyuvante de hidróxido de aluminio y, opcionalmente, comprende, además, un adyuvante de fosfato de aluminio.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la vacuna no comprende ningún adyuvante de fosfato de aluminio.

8. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que los toxoides diftérico y tetánico en el primer volumen se adsorben sobre un adyuvante de hidróxido de aluminio.

9. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el primer volumen está libre de conservantes mercuriales.

10. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el primer volumen incluye un conservante por ejemplo, 1-hidroxi-2-fenoxietano.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el primer volumen incluye aproximadamente 5 g / l de 1-hidroxi-2-fenoxietano.

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el primer volumen está libre de conservantes.

13. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el toxoide diftérico y el toxoide tetánico en el primer volumen están presentes a una relación de difteria : tétanos de aproximadamente de 2,5 : 1 (medida en unidades Lf).

14. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el primer volumen incluye entre 5 mg y 6 mg de cloruro de sodio por 100 Lf de toxoide diftérico y / o está libre de polisorbato 80.

15. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el segundo volumen está libre de sales de aluminio y / o está libre de conservantes mercuriales y / o está libre de conservantes y / o está libre de polisorbato 80.

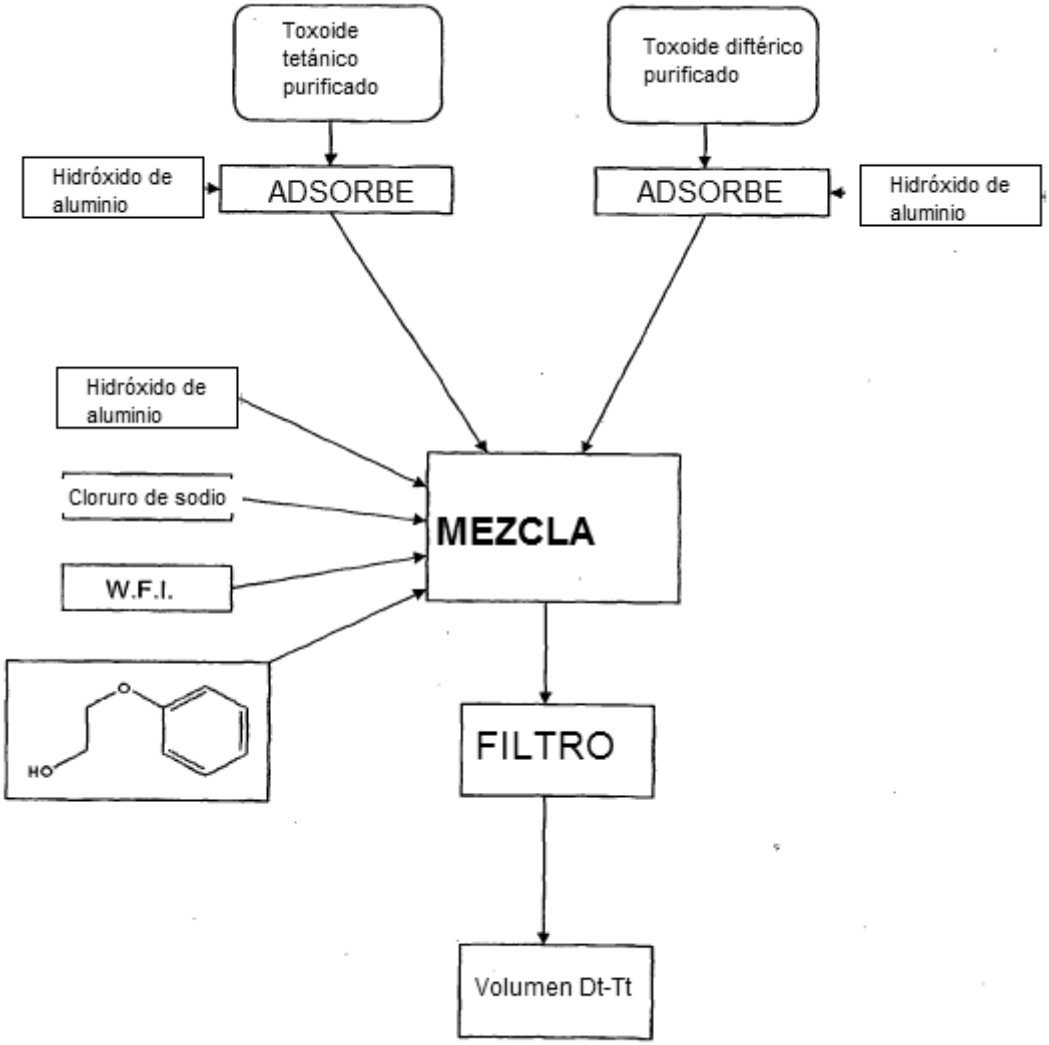
16. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la vacuna tiene un contenido en Al3+ de entre 0,25 mg / ml y 1,5 mg / ml, por ejemplo un contenido en Al3+ de aproximadamente 0,6 mg / ml.

17. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, que comprende además una etapa de envasado de la vacuna en recipientes, por ejemplo, en elque el recipiente es un vial o en el que el recipiente es una jeringa.

18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 17, en el que la vacuna tiene (i) el siguiente contenido por mililitro: 5 Lf de toxoide diftérico; 10 Lf de toxoide tetánico; 16 µg de toxina pertussis inactivada; 16 µg de hemaglutinina filamentosa; 5 µg pertactina o (ii) el siguiente contenido por mililitro: 5 Lf de toxoide diftérico; 10 Lf de toxoide tetánico; 16 µg de toxina pertussis inactivada; 16 µg de hemaglutinina filamentosa; 5 µg de pertactina; 80 DU de poliovirus de la cepa Mahoney; 16 DU de poliovirus de la cepa MEF1; y 64 DU poliovirus de la cepa Saukett.

19. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la vacuna está libre de conservantes.

FIGURA 1


Toxoide tetánico purificado
Toxoide diftérico purificado
Hidróxido de aluminio
ADSORBE
ADSORBE
Hidróxido de aluminio
Hidróxido de aluminio
Cloruro de sodio
W.F.I.
MEZCLA
HO
FILTRO
Volumen Dt-Tt