

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 089**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2012 PCT/GB2012/050883**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12143732**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12719034 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2699255**

54 Título: **Proceso de preparación de composición de vacuna**

30 Prioridad:

**21.04.2011 GB 201106802**

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

**22.05.2017**

73 Titular/es:

**ALLERGY THERAPEUTICS (UK) LIMITED  
(100.0%)**

**Dominion Way  
WorthingWest Sussex BN14 8SA, GB**

72 Inventor/es:

**SKINNER, MURRAY;  
HEWINGS, SIMON;  
PACKER, DUNCAN y  
POLAND, RICHARD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 613 089 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**

Proceso de preparación de composición de vacuna

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la fabricación de una composición estéril que comprende un antígeno modificado unido a un aminoácido.

## 10 Antecedentes de la invención

La vacunación es la aplicación más conocida y más exitosa de los principios inmunológicos para la salud humana. Para su introducción y aprobación, una vacuna debe ser efectiva y la eficacia de las vacunas se revisa de vez en cuando. Una vacuna efectiva debe: inducir la respuesta inmunológica deseada; ser estable durante su almacenamiento; y tener la suficiente inmunogenicidad. Con las vacunas no vivas, en particular, a menudo es necesario controlar la liberación del antígeno después de la administración.

15

La unión de un antígeno a un aminoácido en suspensión se ha demostrado que resulta en la liberación lenta del antígeno después de la administración, lo que aumenta la seguridad mientras optimiza su eficacia al prolongar la exposición. Sin embargo, la fabricación de formulaciones que comprenden tales antígenos es problemática, ya que la adsorción del antígeno a los aminoácidos da lugar a subproductos químicos no deseados que se deben eliminar. Además, el proceso debe realizarse en condiciones estériles. Puesto que el producto final es una suspensión que no se puede esterilizar por filtración y dado que el componente activo es biológico no se puede esterilizar por calor. Por consiguiente, a menudo se fabrican suspensiones estériles por centrifugación dentro de una habitación aséptica.

20

La patente US 4.070.455 describe micro-partículas de tirosina finamente divididas que tienen un alérgeno tratado de glutaraldehído disperso en las mismas. Las micro-partículas se preparan mezclando una solución de tirosina en un ácido fuerte acuoso con una solución de polen de ambrosía tratada con glutaraldehído y a continuación la neutralización de la solución resultante. Las micro-partículas finas de tirosina que contiene el alérgeno modificado se eliminan por centrifugación.

25

El documento EP 0988862 describe la formulación de un antígeno, un adyuvante que induce TH-1 y un aminoácido poco soluble en agua para su uso en inmunización. La formulación se prepara mezclando una solución de un antígeno y el adyuvante que induce TH1 con una solución del aminoácido o derivado poco soluble en un ácido fuerte acuoso, mientras se neutraliza la mezcla de soluciones, con lo que el aminoácido poco soluble y el antígeno co-precipitan. El precipitado resultante se retira de la solución por centrifugación, se reconstituye con tampón fresco y se añade el adyuvante.

30

El documento WO 98/44947 A1 desvela la adsorción de alérgeno con tirosina en el que el precipitado se separa de la solución por centrifugación.

35

El uso de centrifugación para separar el precipitado de aminoácidos/antígeno requiere un grado sustancial de exposición aséptica y una alta dependencia de la interacción del operador. La presente invención aborda este problema.

## 40 Sumario de la invención

45

La presente invención supera los problemas de la técnica anterior mediante la creación de un sistema que separa el adsorbato de antígeno/aminoácido usando filtración de flujo transversal. Los sistemas adaptan filtros de acero inoxidable sinterizados esterilizables por vapor utilizados rutinariamente en la filtración sin salida mediante su inclusión en un sistema de circuito circulatorio cerrado diseñado a medida. Esto permite que el adsorbato de antígeno/aminoácido y los subproductos químicos que puedan eliminar a través del filtro a medida que se añade tampón para mantener el volumen y la especificación.

50

El requisito tecnológico surgió en base a la incapacidad para esterilizar terminalmente o, filtrar el producto del adsorbato de tirosina modificado con alérgeno (ATMA) que es insoluble y se debe fabricar en una instalación estéril. Con el fin de asegurar la esterilidad era necesario desarrollar un sistema de limpieza cerrada in situ (LIS) o de vapor in situ (VIS). La naturaleza cerrada del sistema significa que el componente insoluble ATMA se debía mantener en suspensión en la solución durante las etapas de intercambio de la formulación y del tampón. Para lograr esto, se desarrolló un sistema de filtración de flujo transversal continuo como se describe en el presente documento.

55

Debido a la naturaleza cerrada y a la capacidad de esterilizar con vapor, es posible situar los equipos fuera de la habitación aséptica (aunque dentro de las zonas controladas de producción). Por lo tanto la presente invención tiene distintas ventajas sobre los métodos de producción existentes. El método de la invención reduce sustancialmente la exposición del producto antigénico al medio ambiente al tener un sistema aséptico cerrado. El método también

60

reduce la necesidad de intervención física, eliminando del método el riesgo tanto de errores como de contaminación microbiana.

5 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de preparación de una composición que comprende uno o más antígenos modificados con glutaraldehído adsorbido en tirosina en el que dicho método comprende:

- 10 (i) mezclar una solución de uno o más antígenos modificados con glutaraldehído con una solución de tirosina en un ácido acuoso, mientras se neutraliza la mezcla de soluciones, formando de este modo un adsorbato que comprende el uno o más antígenos y tirosina,  
(ii) separar el adsorbato en un tampón por filtración de flujo transversal formando de ese modo dicha composición; y  
(iii) recuperar dicha composición;

15 en el que las etapas (i) a (iii) se realizan en un ambiente estéril y dentro de un sistema cerrado.

En una realización particularmente preferida, el uno o más antígenos proceden del polen, ácaros, mohos, bacterias o virus.

20 En una realización, el método comprende la preparación de una composición que comprende uno o más antígenos de polen modificados con glutaraldehído y adsorbidos en tirosina que comprende:

- 25 (i) modificar uno o más antígenos de polen con glutaraldehído;  
(ii) eliminar el exceso de glutaraldehído usando filtración de flujo transversal para formar una solución de polen modificado;  
(iii) mezclar la solución de polen modificado con una solución de la tirosina en un ácido acuoso, mientras se neutraliza la mezcla de soluciones, formando de este modo un adsorbato que comprende el polen modificado y la tirosina;  
(iv) separar el adsorbato en un tampón por filtración de flujo transversal formando de ese modo dicha composición; y  
30 (v) recuperar dicha composición;

35 en el que las etapas (iii) a (v) se realizan en un ambiente estéril y dentro de un sistema cerrado. Preferentemente las etapas (iii) a (v) se realizan en un ambiente UE GMP de grado 'C'/ISO clase 7. Preferentemente las etapas (i) y (ii) se realizan en un ambiente UE GMP de grado 'B'/ISO clase 5.

En otra realización, el método comprende la preparación de una composición que comprende uno o más antígenos de polen modificados con glutaraldehído y adsorbidos a tirosina en el que dicho método comprende:

- 40 (i) extraer el uno o más antígenos de polen en solución para formar una solución de extracto de polen;  
(ii) filtrar la solución de extracto de polen para eliminar los sólidos;  
(iii) realizar la filtración de flujo transversal y aislar la fracción retenida que comprende el antígeno de polen;  
(iv) modificar el uno o más antígenos de polen con glutaraldehído;  
(v) eliminar el exceso de glutaraldehído usando filtración de flujo transversal para formar una solución de polen modificado;  
45 (vi) filtrar a esterilidad la solución de polen modificado;  
(vii) mezclar la solución de polen modificado con una solución de tirosina en un ácido acuoso, mientras se neutraliza la mezcla de soluciones, formando de este modo un adsorbato que comprende el polen modificado y la tirosina;  
50 (viii) separar el adsorbato en un tampón por filtración de flujo transversal formando de ese modo dicha composición; y  
(ix) recuperar dicha composición

55 en las que las etapas (vii) a (ix) se realizan en un ambiente estéril y dentro de un sistema cerrado. Preferentemente las etapas (vii) a (ix) se realizan en un ambiente UE GMP de grado 'C'/ISO clase 7. Preferentemente las etapas (i) a (vi) se realizan en un ambiente UE GMP de grado 'B'/ISO clase 5.

60 El antígeno de polen puede ser, pero no se limita a, polen de Agrostis, polen de cola de zorra, polen de vernal dulce, polen de avena falsa, polen Brome, polen de cola de perro, polen de pasto azul, polen de festuca, polen de heno blanco, polen de gramíneas de centeno, polen de hierba timotea, polen de prado y polen de centeno cultivado.

Preferentemente, el uno o más antígenos consiste en polen de Agrostis, polen de cola de zorra, polen de vernal dulce, polen de avena falsa, polen Brome, polen de cola de perro, polen de pasto azul, polen de festuca, polen de heno blanco, polen de gramíneas de centeno, polen de hierba timotea, polen de prado y polen de centeno cultivado.

65 Preferentemente, la solución de extracto de polen se filtra usando un filtro de tamaño de poro de 0,2 µm.

Dicho de otra manera, la composición comprende preferentemente todos los pólenes del grupo formado por el polen de *Agrostis*, polen de cola de zorra, polen de vernal dulce, polen de avena falsa, polen *Brome*, polen de cola de perro, polen de pasto azul, polen de festuca, polen de heno blanco, polen de gramíneas de centeno, polen de hierba timotea, polen de prado y polen de centeno cultivado.

Preferentemente, el polen se extrae en una solución salina fenólica tamponada, preferentemente a pH 6,5 (preferentemente que contiene cloruro de sodio, dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato disódico dodecahidratado, 80 % en p/p de fenol licuado y agua para inyección (API)) de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 °C, más preferentemente a aproximadamente 5 °C.

Preferentemente, la extracción se realiza durante aproximadamente 12 a 30 horas, más preferentemente de aproximadamente 14 a aproximadamente 24 horas, aún más preferentemente durante aproximadamente 18 horas.

Preferentemente, la filtración de flujo transversal usada para aislar la fracción retenida y/o para eliminar el exceso de glutaraldehído tal como se describe en el presente documento se realiza usando una membrana con peso molecular de corte de 5-10kDa cortado. Más preferentemente, la membrana tiene un peso molecular de corte de 10 kDa.

Preferentemente, la filtración de flujo transversal que se usa para separar el adsorbato se realiza usando un filtro de acero inoxidable poli-sinterizado, más preferentemente un filtro de acero inoxidable poli-sinterizado de 5 µm, preferentemente con una presión de entre 1,1 y 1,3 x 10<sup>5</sup> Pa.

El adsorbato que comprende el antígeno y la tirosina se forma mezclando el antígeno con tirosina en un ácido fuerte, preferentemente un ácido inorgánico, preferentemente ácido clorhídrico (HCl), mientras se neutraliza la mezcla, preferentemente con NaOH. Por neutralización se entiende un ajuste del pH a un valor dentro del intervalo de 6,5 a 7,5, preferentemente de 6,8 a 7,2. Es deseable que en ningún momento, o al menos durante un tiempo no demasiado prolongado, durante la neutralización el pH se desplace del equilibrio, es decir, se mueva fuera del intervalo de pH 6,5 a 7,5 o superior preferentemente fuera del intervalo de pH 6,8 a 7,2.

Preferentemente, el ácido fuerte es HCl que tiene una molaridad de aproximadamente 3,5 M a aproximadamente 4,5 M, preferentemente de aproximadamente 3,8 M. Preferentemente, el NaOH tiene una molaridad de aproximadamente 3 a aproximadamente 3,5, preferentemente de aproximadamente 3,2 M.

Preferentemente, la composición es una composición de vacuna.

En una realización preferida, la composición es para su uso como vacuna y el antígeno es uno útil en una vacuna de este tipo.

En diversas realizaciones, se puede añadir un adyuvante a la composición, tal como MPL, 3-DMPL o un derivado o sal del mismo.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición preparada por el método de la invención.

Descripción detallada

Ahora se describirán varias características preferidas y realizaciones de la presente invención a modo de ejemplos no limitantes.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de una persona con experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican en la literatura. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press; y E. M. Shevach y W. Strober, 1992 y suplementos periódicos, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY.

#### Antígeno

El término "antígeno" se utiliza para indicar cualquier molécula que pueda ser reconocida específicamente por los elementos adaptativos de la respuesta inmunológica, es decir, por linfocitos B o linfocitos T, o ambos.

El antígeno utilizado en la presente invención preferentemente es un inmunógeno, es decir, un antígeno que activa las células inmunológicas para generar una respuesta inmunológica contra sí mismo.

5 El antígeno se puede obtener por medios recombinantes o síntesis de péptidos, o de fuentes o extractos naturales y puede derivarse de cualquier organismo vivo o no vivo.

10 El antígeno puede derivarse de bacterias, tales como, por ejemplo ántrax, campylobacter, cólera, difteria, E. coli enterotoxigénica, giardia, gonococos, Helicobacter pylori, Hemophilus influenza B, Hemophilus influenza no tipificable, meningococo, pertussis, neumococo, salmonella, shigella, Streptococcus B, Streptococcus del grupo A, tétanos, Vibrio cholerae, Yersinia, Staphylococcus, especies de Pseudomonas y especies de Clostridium.

15 Como alternativa, el antígeno puede derivarse de virus, tales como, por ejemplo, adenovirus, serotipos 1 a 4 del dengue, ébola (Jahrling et al., Arch Virol Suppl., 11: 135-140, 1996), enterovirus, serotipos A a E de la hepatitis (Blum, Digestion 56: 85-95, 1995; Kátkov, Med Clin North Am 80: 189-200, 1996; Lieberman y Greenberg, Adv Pediatr Infect Dis 11: 333-363 1996; Mast et al., Annu Rev Med 47: 257-266, 1996) virus del herpes simple 1 o 2, virus de la inmunodeficiencia humana (Deprez et al., Vaccine 14: 375-382, 1996), influenza, encefalitis equina japonesa, sarampión, Norwalk, virus del papiloma, parvovirus B19, polio, rabia, rotavirus, rubéola, sarampión, viruela, construcciones de viruela que contienen genes que codifican otros antígenos tales como antígenos de malaria, varicela y fiebre amarilla. Los parásitos incluyen, por ejemplo: Entamoeba histolytica (Zhang et al., Infect Immun 63: 1349-1355); Plasmodium (Bathurst et al., Vaccine 11: 449-456, 1993), toxoplasmosis, y los helmintos.

20 En una realización preferida, el antígeno es un alérgeno. El término "alérgeno" se utiliza para describir un antígeno que provoca una hipersensibilidad inmune o una reacción alérgica no deseada. Una alergia es una respuesta de hipersensibilidad a un antígeno ambiental (alérgeno).

25 El alérgeno utilizado en la presente invención puede derivarse de cualquier sustancia que causa alergia, tal como, pero no limitado a, polen (por ejemplo, polen de Agrostis, polen de cola de zorra, polen de vernal dulce, polen de avena falsa, polen Brome, polen de cola de perro, polen de pasto azul, polen de festuca, polen de heno blanco, polen de gramíneas de centeno, polen de hierba timotea, polen de prado, polen de centeno cultivado, polen de ambrosía, polen de artemisa, polen de abedul, polen de azafrán, polen de avellana, polen de olivo, polen de Pariateria, polen de arce (Acer negundo), polen de ciprés y polen de cedro japonés (Cryptomeria japonica), alimentos, veneno de insectos, materiales derivados de hongos y animales tales como pieles de animales o ácaros tales como ácaros del polvo doméstico (por ejemplo, D. farinae o D. pteronyssinus o B. tropicalis).

35 Preferentemente, el antígeno utilizado en la presente invención es un antígeno de polen. Preferentemente, los antígenos de polen son el polen de Agrostis, polen de cola de zorra, polen de vernal dulce, polen de avena falsa, polen Brome, polen de cola de perro, polen de pasto azul, polen de festuca, polen de heno blanco, polen de gramíneas de centeno, polen de hierba timotea, polen de prado y polen de centeno cultivado.

40 El antígeno puede estar modificado químicamente por reacción con sustancias conocidas, por ejemplo, pero no limitado a formaldehído o glutaraldehído, preferentemente glutaraldehído, que retienen o mejoran las propiedades inmunogénicas del antígeno deseadas mientras ayudan a evitar efectos adversos no deseados. Tales modificaciones son conocidas en la técnica.

#### 45 Aminoácidos

El aminoácido usado en la invención es tirosina.

50 También se incluyen dentro del alcance de la presente invención derivados farmacéuticamente aceptables de tirosina, tales como bencil-O-octadecanoil-L-tirosina.

#### Preparación

55 La composición de la presente invención se prepara mezclando una solución acuosa del antígeno con una solución de la tirosina en un ácido acuoso fuerte y neutralización de la mezcla de la solución, con lo que la tirosina y el antígeno co-precipitan.

60 Normalmente se mezcla una solución acuosa del antígeno, preferentemente a un pH de 6,3 a 7,2, con una solución de la tirosina en un ácido fuerte acuoso. El ácido fuerte habitualmente es un ácido inorgánico, preferentemente ácido clorhídrico. La solución de antígeno utilizada en esta etapa normalmente contiene hasta 0,15 g de proteína de antígeno/ml. En una realización, la solución de tirosina utilizada es de aproximadamente el 24 % en p/v.

65 La mezcla resultante de las soluciones de antígeno y tirosina está neutralizada. Es deseable que, en ningún momento, o al menos durante un tiempo no demasiado prolongado, durante la neutralización el pH se desvíe del equilibrio. Esta condición se puede cumplir mediante agitación vigorosa de la solución y mediante el uso solamente de la cantidad requerida de base, si se desea. Se pueden añadir varios agentes tamponantes útiles tales como

solución salina tamponada a las soluciones de antígeno para ayudar a controlar el pH durante las etapas de mezcla y neutralización.

Un método particularmente útil para llevar a cabo la neutralización es llevar corrientes separadas de la solución de aminoácido y la base neutralizante a la solución de antígeno. Los caudales de las soluciones añadidas se controlan por el estado del pH, es decir, por el equipo que regula el flujo de una o ambas las soluciones, de manera que el pH de la mezcla de reacción permanece sustancialmente constante a un nivel predeterminado. Hemos encontrado que normalmente se obtienen resultados óptimos por el control del pH dentro del intervalo de 6,5 a 7,5, preferentemente de 6,8 a 7,2, aunque el pH exacto puede variar según la naturaleza del antígeno.

El resultado de la neutralización es la precipitación inmediata de la tirosina, dentro y/o sobre la que se ocluye y/o se adsorbe la solución de antígeno.

#### Filtración de flujo transversal

Un método que ha sido útil en el fraccionamiento de diversas partículas es la filtración de flujo transversal o filtración de flujo tangencial (FFT). La filtración de flujo transversal es un proceso de separación que utiliza membranas para separar los componentes en una solución o suspensión líquida en base a su tamaño o a diferencias en el peso molecular. En la filtración de flujo transversal, la solución o suspensión a filtrar se hace pasar a través de la superficie de la membrana en un modo de flujo transversal. La fuerza motriz para la filtración es la presión transmembrana. La velocidad a la cual se hace pasar el filtrado a través de la superficie de la membrana también controla la velocidad de filtración y ayuda a prevenir la obstrucción de la membrana. Debido a que la filtración de flujo transversal recircula la fracción retenida a través de la superficie de la membrana, el ensuciamiento de la membrana se reduce al mínimo, se mantiene una alta tasa de filtración, y se mejora la recuperación del producto.

Los dispositivos de filtración de flujo transversal generalmente comprenden una bomba, un depósito de solución de alimentación, un módulo de filtración y conductos para la conexión de estos elementos. Durante su uso, la solución de alimentación se dirige desde el depósito de solución de la alimentación al módulo de filtración, mientras que la fracción retenida procedente del módulo de filtración se recircula desde el módulo de filtración hacia el depósito de la solución de alimentación hasta que se obtenga el volumen deseado de material retenido.

La filtración de flujo transversal utilizada en la presente invención para separar el adsorbato que comprende el antígeno modificado y el aminoácido se lleva a cabo preferentemente utilizando un filtro de acero inoxidable poli-sinterizado de un tamaño de poro de 5  $\mu\text{m}$  que mantiene una presión de entre 1,1 y 1,3 x 10<sup>5</sup> Pa.

#### Sistema cerrado

Un sistema cerrado es un sistema aislado que evita la exposición de la composición al entorno fuera del sistema. La composición solo se expone al entorno inmediato de los componentes de la tubería y de la máquina que componen el sistema cerrado. El sistema cerrado de la presente invención evita la contaminación de la composición. Esto se logra garantizando que la composición esté sellada del entorno externo al sistema, evitando que entren contaminantes en el sistema.

#### Adyuvante

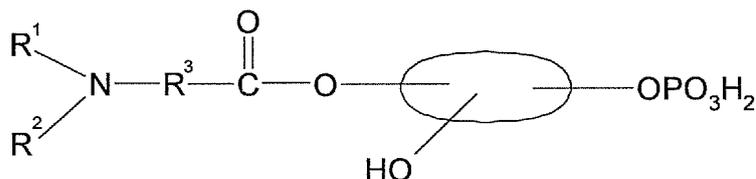
Se puede añadir un adyuvante a la composición producida por el método de la presente invención. Preferentemente, el adyuvante es un adyuvante que induce TH1. Un adyuvante que induce TH1 es un adyuvante que potencia la respuesta TH1 para un antígeno.

La eficacia de un adyuvante tal como un adyuvante que induce TH1 se puede determinar mediante el perfil de anticuerpos dirigidos contra un antígeno como resultado de la administración de este antígeno en vacunas que también se componen de los diversos adyuvantes.

Preferentemente, el adyuvante es un lipopolisacárido modificado. Como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.912.094, el lipopolisacárido (LPS) de enterobacterias es un potente inmunoestimulante. Sin embargo, también puede desencadenar respuestas perjudiciales, y a veces fatales. Ahora se sabe que las actividades endotóxicas asociadas al LPS resultan de su componente lípido A. En consecuencia, la presente invención usa más preferentemente un derivado destoxificado del lípido A. Ribi ImmunoChem produjo un derivado del lípido A conocido originalmente como endotoxina detoxificada refinada (EDR), pero que se ha conocido como monofosforil lípido A (MPL). Como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.912.094, el MPL se produce por reflujo de LPS o lípido A obtenidos a partir de mutantes sin heptos de bacterias gram negativas (por ejemplo, Salmonella sp.) en soluciones de ácidos minerales de fuerza moderada (por ejemplo, HCl 0,1 N) durante un período de aproximadamente 30 minutos. Este tratamiento resulta en la pérdida de la fracción fosfato en la posición 1 de la glucosamina en el extremo reductor. Además, durante este tratamiento se elimina el núcleo carbohidrato de la posición 6' de la glucosamina no reductora.

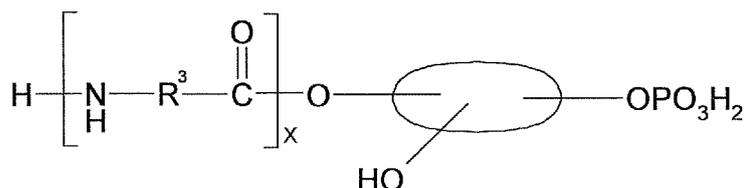
Sin embargo, preferentemente se usa un LPS o lípido A modificado en el que el lípido A detoxificado retiene la fracción del núcleo unido a la posición 6' de la glucosamina no reductora. Dichos derivados de LPS y lípido A se describen también en la patente de Estados Unidos n.º 4.912.094. Con más detalle, la patente de Estados Unidos 4.912.094 desvela un lipopolisacárido modificado que se obtiene por el método de eliminación selectiva solo del resto de acilo β-hidroximiriístico del lipopolisacárido que está unido como éster a la glucosamina en el extremo reductor en la posición 3' de dicho lipopolisacárido, que comprende someter dicho lipopolisacárido a hidrólisis alcalina. Dichos monofosforil lípido A (MPL), difosforil lípido A (DPL) y LPS des-O-acilados se pueden usar en la presente invención. Así, en una realización preferida, la presente invención usa MPL, DPL o LPS, en los que la posición 3' de la glucosamina del extremo reductor está des-O-acilada. Estos compuestos son conocidos como 3-DMPL, 3-DDPL y 3-DLPS, respectivamente.

En la patente de Estados Unidos 4.987.237, se describen derivados de MPL que tienen la fórmula:

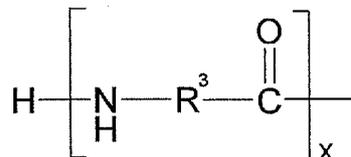


y en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son H, R<sup>3</sup> es un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada compuesto por C, H y opcionalmente O, N y S, en el que más de un átomo pueden ser iguales o diferentes, en el que el número total de átomos de carbono no excede de 60, y el círculo representa un núcleo MPL.

Como alternativa, el derivado de MPL tiene la fórmula



en la que el segmento del derivado representado por



contiene 2-60 átomos de C y en la que R<sup>3</sup> es un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada compuesto por C, H y opcionalmente O, N y S, en el que más de un átomo pueden ser iguales o diferentes, y x es un mínimo de 1 y puede ser cualquier número entero tal que el número total de átomos de C en todos los segmentos x no exceda de 60, y en el que la estructura química de cada R<sup>3</sup> pueda ser igual o diferente en cada uno de dichos segmentos y en el que el círculo representa un núcleo MPL.

En la presente invención se pueden usar todos estos derivados o sales de LPS o del lípido A que están o se vuelven disponibles. Preferentemente, los derivados y sales son aquellos que son farmacéuticamente aceptables.

#### Dosificación y administración de composiciones

Las composiciones producidas por la presente invención se pueden administrar a un sujeto de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar, que generalmente está en el intervalo de 5 µg a 250 µg de antígeno por dosis, depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para sintetizar anticuerpos y del grado de protección deseado. Un intervalo preferible es de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 40 µg por dosis.

Un tamaño de dosis adecuado es de aproximadamente 0,5 ml. Por consiguiente, una dosis para la inyección subcutánea, por ejemplo, comprendería 0,5 ml que contienen 20 µg de inmunógeno en mezcla con el 0,5 % de adyuvante.

Las cantidades precisas del ingrediente activo requeridas para su administración pueden depender de la opinión del médico y pueden ser particulares para cada sujeto.

La composición se puede administrar en un solo programa de dosis, o preferentemente en un programa de dosis múltiple. Un programa de dosis múltiple es aquel en el que un curso primario de vacunación puede ser con 1-20 dosis separadas, seguido de otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores requeridos para mantener y/o reforzar la respuesta inmunológica, por ejemplo, de 1 a 4 meses para una segunda dosis, y si es necesario, una(s) dosis posterior(es) después de varios meses. El régimen de dosificación también estará determinado, al menos en parte, por la necesidad del individuo y dependerá del criterio del médico.

Además, la composición que contiene el antígeno(s) se puede administrar junto con otros agentes inmunorreguladores, por ejemplo, inmunoglobulinas.

#### Descripción de las Figuras

Figura 1. Representación esquemática del sistema de filtración de flujo transversal usado para separar el adsorbato de aminoácidos

Figura 2. Esquema del filtro de acero inoxidable poli-sinterizado utilizado en la filtración de flujo transversal; la Figura muestra la carcasa del filtro (A) y el montaje in situ (B)

Figura 3. Esquema de la extracción de antígenos del polen en solución de extracto. La solución de Evans en VL001 se enfría a 5 °C +/- 3 °C, se extraen 2000 ml y se utilizan para suspender el polen previamente pesado. A continuación esta suspensión se añade a VL001 donde se extrae durante 18 horas con el tiempo y la temperatura controlados y registrado por el PLC y un registrador de datos asociado. La solución del extracto se filtra a través de un tren filtros de 0,2 µm antes de pasar a la siguiente etapa.

Figura 4. Esquema de la filtración de flujo transversal para aislar la fracción retenida que comprende el antígeno de polen. La solución del extracto se recircula a través del cartucho del filtro de FFT, donde la diafiltración elimina la materia de bajo PM como residuo y retiene la materia de alto PM en la solución circulante. El volumen recibido en el residuo se sustituye por la solución de Evans bombeado en TNK01. Esto se realiza hasta que se han producido 5 cambios de volumen.

Figura 5. Esquema de la modificación de los antígenos del polen con glutaraldehído. Se añade glutaraldehído previamente pesado a la solución diafiltrada. Una vez añadido, la solución se deja en agitación para su modificación durante 1-2 horas.

Figura 6. Esquema de la eliminación del exceso de glutaraldehído. Una vez que se ha completado la modificación, se repite la diafiltración otra vez hasta que se han producido 5 cambios de volumen. Esto actúa para eliminar todo el glutaraldehído no utilizado durante el proceso de modificación.

Figura 7. Esquema que muestra que la solución modificada se dispensa desde el sistema FFT en el recipiente de adición de fosfato CGV020. A continuación se añade tampón fosfato preparado de antemano y la solución se mezcla. A continuación, está listo para proceder a la etapa de co-precipitación.

Figura 8. Esquema que muestra cómo actúa el control del PLC para igualar las tasas de adición de NaOH y HCl/tirosina para asegurar la neutralización a la velocidad correcta. Durante la etapa de lavado salino asegura que se añada la solución salina reemplazando la pérdida de volumen de los residuos. Todos los datos críticos se registran tanto en papel como en formato electrónico.

Figura 9. Esquema que muestra cómo se reduce la concentración de sal de la solución dentro de VL003 al recircular a través de un filtro de flujo transversal de 5 µm. El volumen perdido en los residuos se sustituye por un tampón de baja concentración salina que disminuye el contenido de sal en general.

Figura 10. Esquema que muestra que una vez que se han completado los lavados de solución salina se aplica aire comprimido filtrado estéril a VL003 forzando la salida de la suspensión a través de una línea de transferencia a un recipiente de retención VL005 dedicado, situado en la habitación aséptica.

Figura 11. Esquema que muestra que entonces se repite la reacción de co-precipitación con la mezcla de extracto modificado/tampón de fosfato procedente del sistema de filtración de flujo tangencial

Figura 12. Esquema del sistema de co-precipitación que muestra todas las conexiones.

Figura 13. Diagrama en la etapa de diseño que muestra la relación entre la bomba, el filtro de flujo transversal y el filtro permeado estéril de 0,2 µm a través del cual se extrae el líquido de lavado durante la reducción de la sal de los sólidos en co-precipitación.

Otras características y realizaciones preferidas de la presente invención se describirán ahora a modo de ejemplo no limitante y con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

**Ejemplo**

Trece pólenes de gramíneas (polen de Agrostis, polen de cola de zorra, polen de vernal dulce, polen de avena falsa, polen Brome, polen de cola de perro, polen de pasto azul, polen de festuca, polen de heno blanco, polen de gramíneas de centeno, polen de hierba timotea, polen de prado, y polen de centeno cultivado) se extraen en un recipiente de acero inoxidable fabricado a medida con solución Evans (pH 6,5) (cloruro de sodio, dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato disódico dodecahidratado, 80 % en p/p de fenol licuado y agua para inyección) a 5 °C durante 18 horas con agitación. La mezcla se filtra entonces a 0,2 µm para eliminar los sólidos a través de un filtro Pall o similar. El controlador del proceso regula la temperatura y el refrigerante de flujo al recipiente de extracción. Al final del período de extracción en el proceso, se llevan a cabo ensayos del filtrado para determinar la eficacia del proceso. Estos incluyen el pH, la reactividad de IgE, la potencia de IgG, y el perfil de alérgenos y de polímero.

El extracto de polen ahora se somete a diafiltración pasando a través de un sistema de flujo tangencial Cogent usando una presión trans-membrana de entre 0,2-0,6 x 10<sup>5</sup> Pa para cinco cambios de volumen utilizando una membrana con un peso molecular de corte de 10 kDa. La fracción retenida se dispensa a un recipiente limpio y desinfectado, se añade una solución de glutaraldehído al 10 % en peso y ahora se lleva a cabo la modificación durante 2 horas para formar alergoides. Los beneficios de este proceso son la capacidad de inducir IgE reducidos e IgG retenidos. El grado de modificación varía, pero debe ser del orden del 50 al 100 %.

A continuación, el extracto modificado se somete a una segunda etapa de diafiltración a través del sistema de flujo tangencial Cogent contra solución Evans a pH 7,0 (cloruro de sodio, dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato disódico dodecahidratado, 80 % en p/p de fenol licuado y agua para inyección) utilizando una membrana con un peso molecular de corte de 5 a 10 kDa para eliminar el exceso de glutaraldehído. El extracto final (sustancia medicinal) se somete a una serie de pruebas de control de calidad, incluyendo la pérdida amina primaria; el contenido de proteínas; la reactividad de IgE; la potencia de IgG y el perfil de polímero.

La sustancia farmacológica se filtra de manera estéril a través de un filtro de un tamaño de poro 0,2 µm en un recipiente limpio desinfectado previamente al que se añade tampón de fosfato estéril filtrado adicional (dihidrógeno fosfato de sodio dihidratado, fosfato disódico dodecahidratado, agua para inyección) a la concentración requerida. Simultáneamente se añade L-tirosina estéril al 24 % en ácido clorhídrico 3,8 M e hidróxido de sodio 3,2 M al recipiente de reacción equipado con un agitador de alto cizallamiento y se produce la co-precipitación. Este proceso resulta en un alto contenido de sal que se reduce por lavado del precipitado de tirosina utilizando un filtro de acero inoxidable poli-sinterizado de flujo transversal de 5 µm en un sistema cerrado. Se utiliza un filtro de flujo transversal de 5 µm para lograr la separación y el volumen perdido se reemplaza con tampón de solución salina de baja concentración, a continuación el alergoide adsorbido sobre tirosina se recupera en un recipiente pre-esterilizado limpio y fresco mediante la aplicación de aire comprimido estéril al recipiente de retención forzando la salida de la suspensión. Las tuberías para toda la transferencia de material es de limpieza in situ (LIS)/vapor in situ (VIS).

Después de fabricar la masa activa se mantiene en equipos a medida y se transfiere a un recipiente de dilución para adiciones de tirosina y MPL para la mezcla y llenado aséptico en viales taponados de suero de butilo de 3 ml.

El método ejemplificado tiene control lógico sobre aspectos críticos del proceso y utiliza conexiones estériles Nova Septum para minimizar la posibilidad de resultados de contaminación de falsos positivos. El método tiene controles en el proceso y ensayos en línea para garantizar el cumplimiento. El equipo ha sido diseñado para minimizar la exposición de los operarios a materiales peligrosos y utiliza tecnología de limpieza in situ y de vapor in situ para proporcionar un proceso limpio y estéril completamente validado.

Diversas modificaciones y variaciones de los métodos descritos y el sistema de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son obvias para los expertos en bioquímica y biotecnología o campos relacionados, estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

55

## REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición que comprende uno o más antígenos modificados con glutaraldehído y adsorbidos a tirosina en el que dicho método comprende:

- (i) mezclar una solución de uno o más antígenos modificados con glutaraldehído con una solución de tirosina en un ácido acuoso, mientras se neutraliza la mezcla de soluciones, formando de este modo un adsorbato que comprende el uno o más antígenos y tirosina;
- (ii) separar el adsorbato en un tampón por filtración de flujo transversal formando de ese modo dicha composición; y
- (iii) recuperar dicha composición;

en el que las etapas (i) a (iii) se realizan en un ambiente estéril y dentro de un sistema cerrado.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que los uno o más antígenos proceden de polen.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la preparación de una composición que comprende uno o más antígenos de polen modificados con glutaraldehído y adsorbidos a tirosina en el que dicho método comprende:

- (i) modificar el uno o más antígenos de polen con glutaraldehído;
- (ii) eliminar el exceso de glutaraldehído usando filtración de flujo transversal para formar una solución de polen modificado;
- (iii) mezclar la solución de polen modificado con una solución de la tirosina en un ácido acuoso, mientras se neutraliza la mezcla de soluciones, formando de este modo un adsorbato que comprende el polen modificado y la tirosina;
- (iv) separar el adsorbato en un tampón por filtración de flujo transversal formando de ese modo dicha composición; y
- (v) recuperar dicha composición;

en el que las etapas (iii) a (v) se realizan en un ambiente estéril y dentro de un sistema cerrado.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la preparación de una composición que comprende uno o más antígenos de polen modificados con glutaraldehído y adsorbidos a tirosina en el que dicho método comprende:

- (i) extraer el uno o más antígenos de polen en solución para formar una solución de extracto de polen;
- (ii) filtrar la solución de extracto de polen para eliminar los sólidos;
- (iii) realizar la filtración de flujo transversal y aislar la fracción retenida que comprende el antígeno de polen;
- (iv) modificar el uno o más antígenos de polen con glutaraldehído;
- (v) eliminar el exceso de glutaraldehído usando filtración de flujo transversal para formar una solución de polen modificado;
- (vi) filtrar a esterilidad la solución de polen modificado;
- (vii) mezclar la solución de polen modificado con una solución de tirosina en un ácido acuoso, mientras se neutraliza la mezcla de soluciones, formando de este modo un adsorbato que comprende el polen modificado y la tirosina;
- (viii) separar el adsorbato en un tampón por filtración de flujo transversal formando de ese modo dicha composición; y
- (ix) recuperar dicha composición

en el que las etapas (vii) a (ix) se realizan en un ambiente estéril y dentro de un sistema cerrado.

5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que la composición comprende los antígenos de polen: polen de Agrostis, polen de cola de zorra, polen de vernal dulce, polen de avena falsa, polen Brome, polen de cola de perro, polen de pasto azul, polen de festuca, polen de heno blanco, polen de gramíneas de centeno, polen de hierba timotea, polen de prado y polen de centeno cultivado.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 en el que la etapa de extracción (i) se lleva a cabo utilizando una solución fenólica tamponada de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 °C durante aproximadamente 18 horas.

7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que la eliminación del exceso de glutaraldehído usando filtración de flujo transversal se lleva a cabo usando una membrana con un peso molecular de corte de 5 a 10 kDa.

8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que la separación del adsorbato que comprende el antígeno y la tirosina usando filtración de flujo transversal se realiza utilizando un filtro de acero inoxidable poli-sinterizado.
- 5 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el filtro de acero inoxidable poli-sinterizado es un filtro de tamaño de poro de 5  $\mu\text{m}$ .
- 10 10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que el adsorbato que comprende el antígeno y la tirosina se forma mezclando el antígeno con tirosina en HCl que tiene una molaridad de aproximadamente 3,8 M mientras se neutraliza la mezcla con NaOH que tiene una molaridad de aproximadamente 3,2 M.
11. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que dicha composición se diluye a la concentración deseada para su uso parental.
- 15 12. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que se añade un adyuvante a dicha composición.
- 20 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 en el que el adyuvante es MPL, 3-DMPL o un derivado o una sal del mismo.

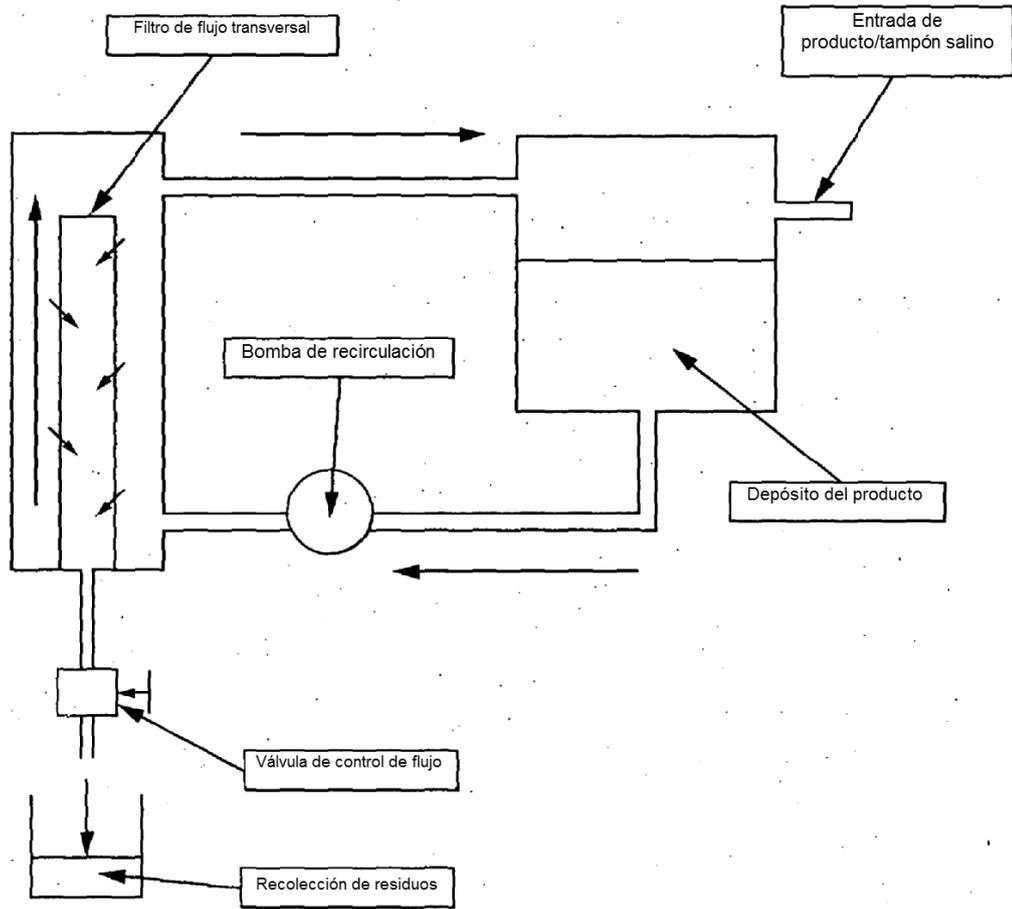


FIG. 1

Filtro de acero inoxidable poli-sinterizado utilizado en la filtración de flujo transversal, la figura muestra el filtro, la carcasa del filtro (A) y el montaje in situ (B)

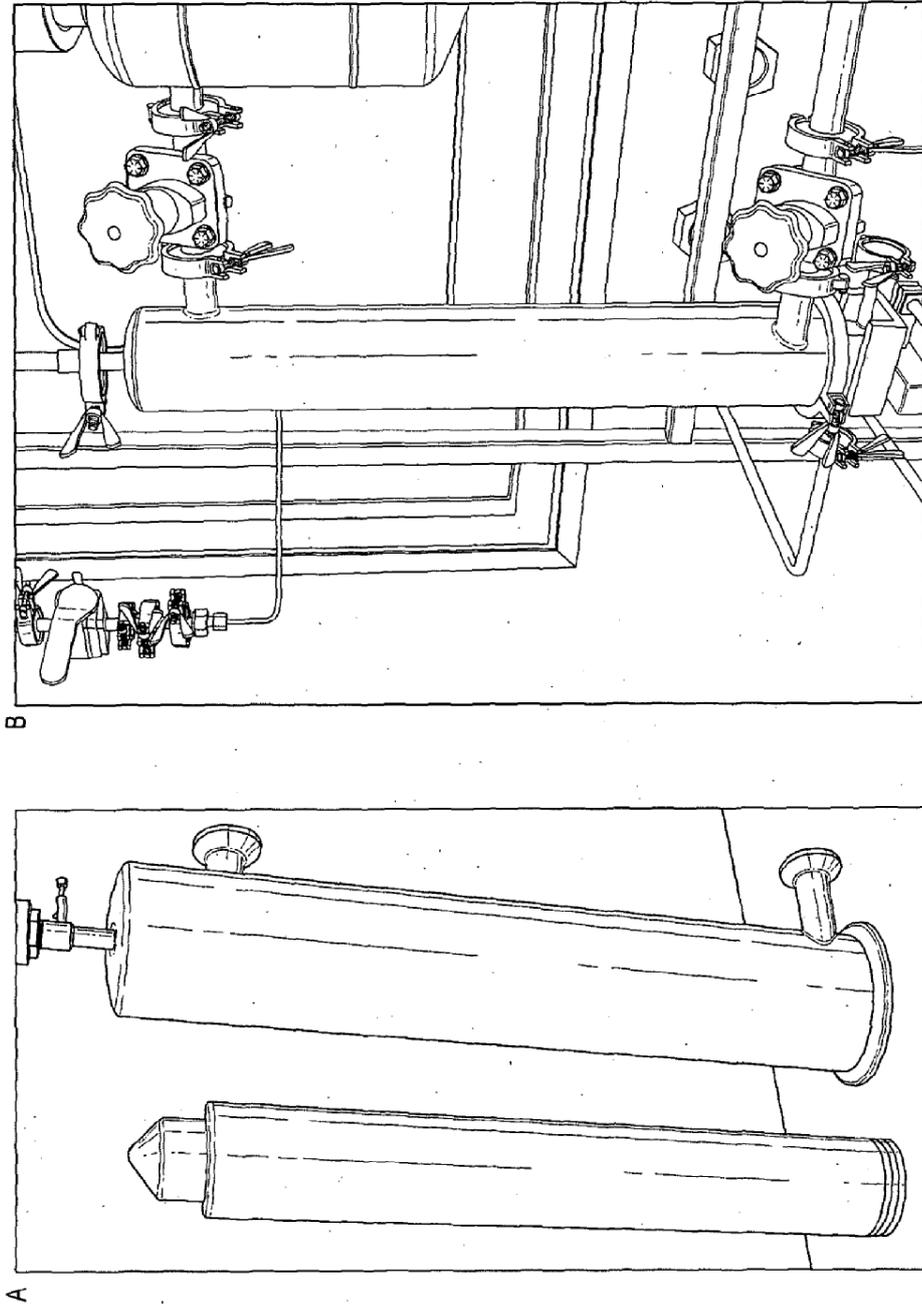
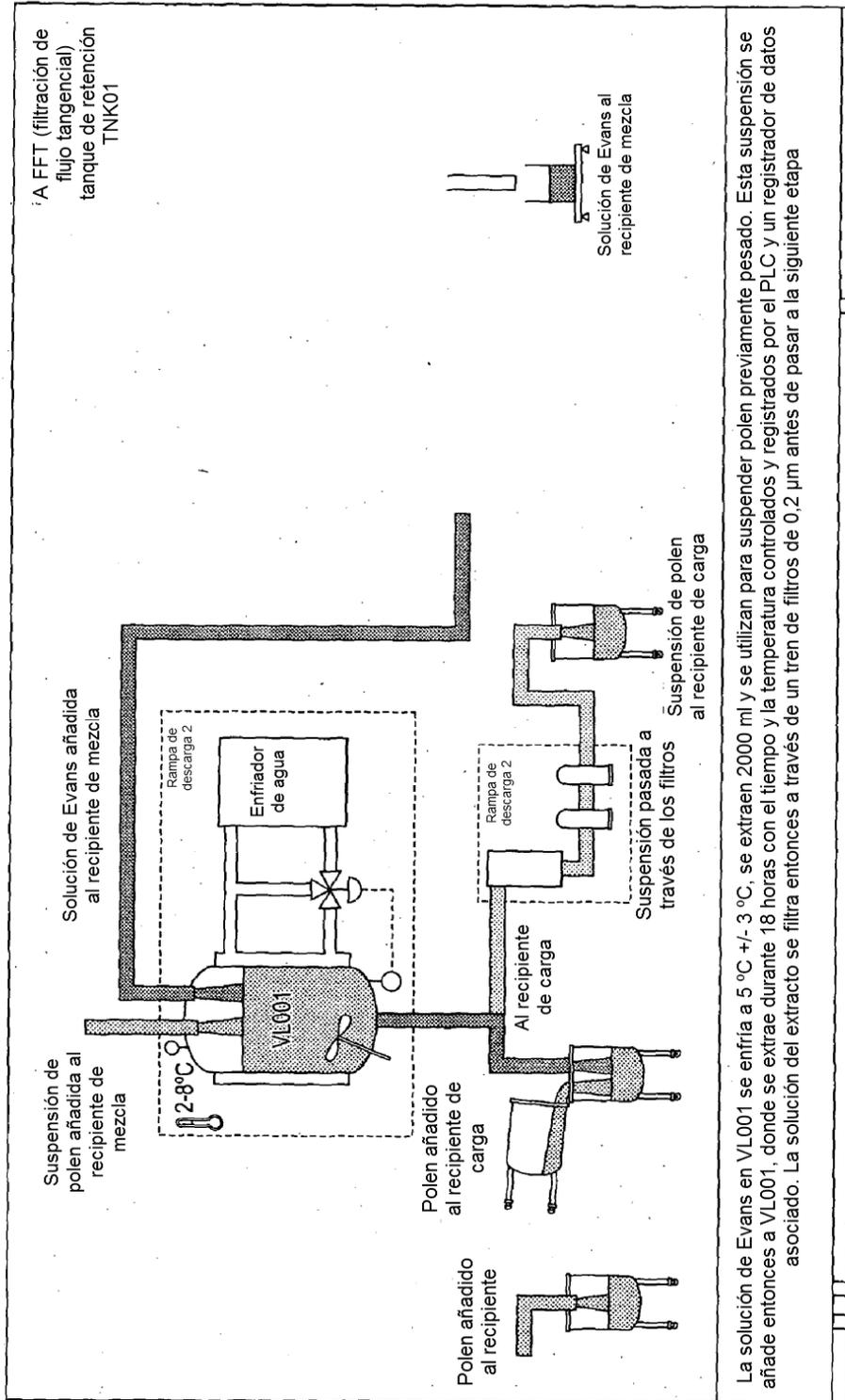


FIG. 2

Extracción y filtración gruesa



La solución de Evans en VL001 se enfría a 5 °C +/- 3 °C, se extraen 2000 ml y se utilizan para suspender polen previamente pesado. Esta suspensión se añade entonces a VL001, donde se extrae durante 18 horas con el tiempo y la temperatura controlados y registrados por el PLC y un registrador de datos asociado. La solución del extracto se filtra entonces a través de un tren de filtros de 0,2 µm antes de pasar a la siguiente etapa

FIG. 3

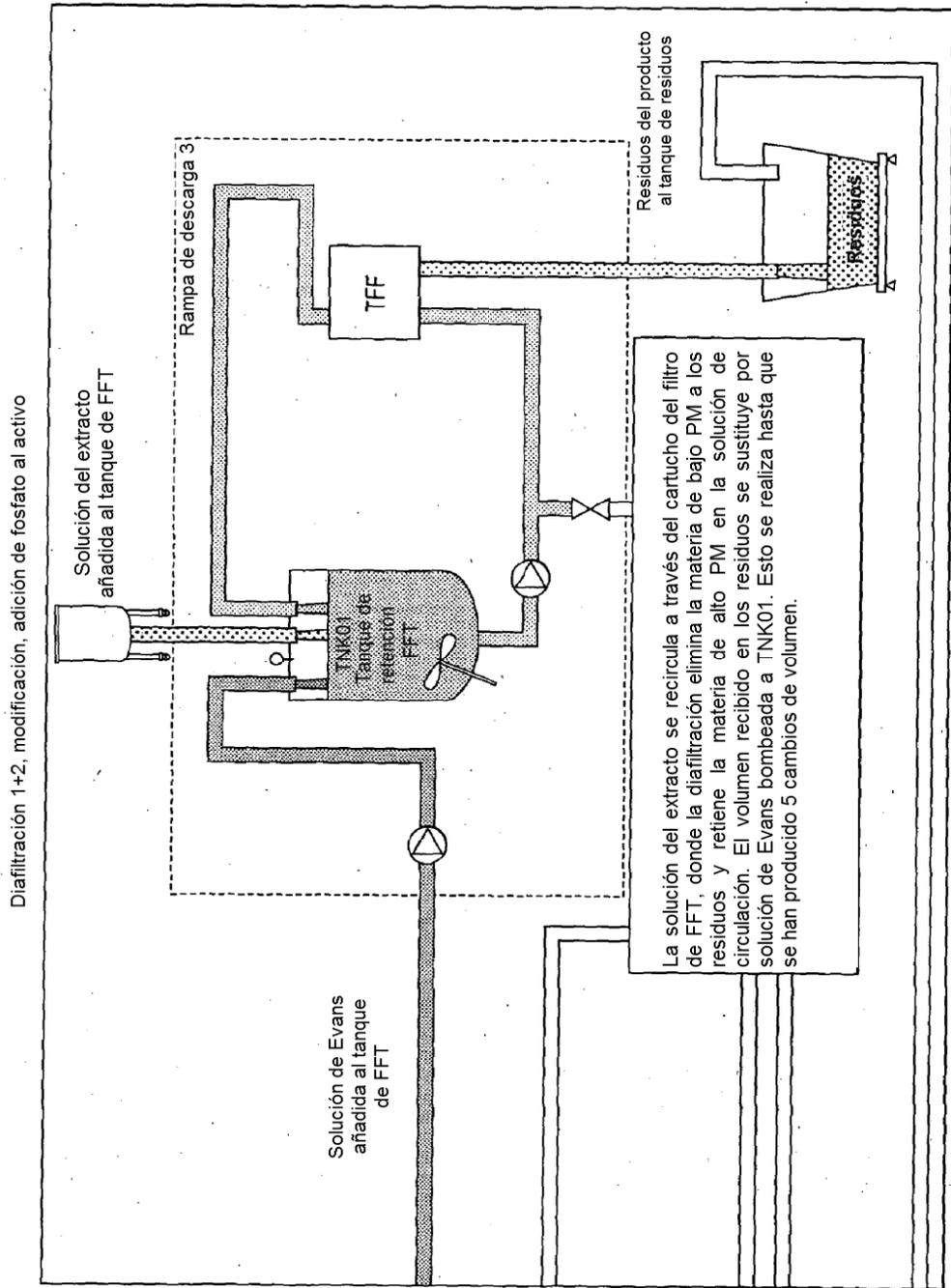


FIG. 4

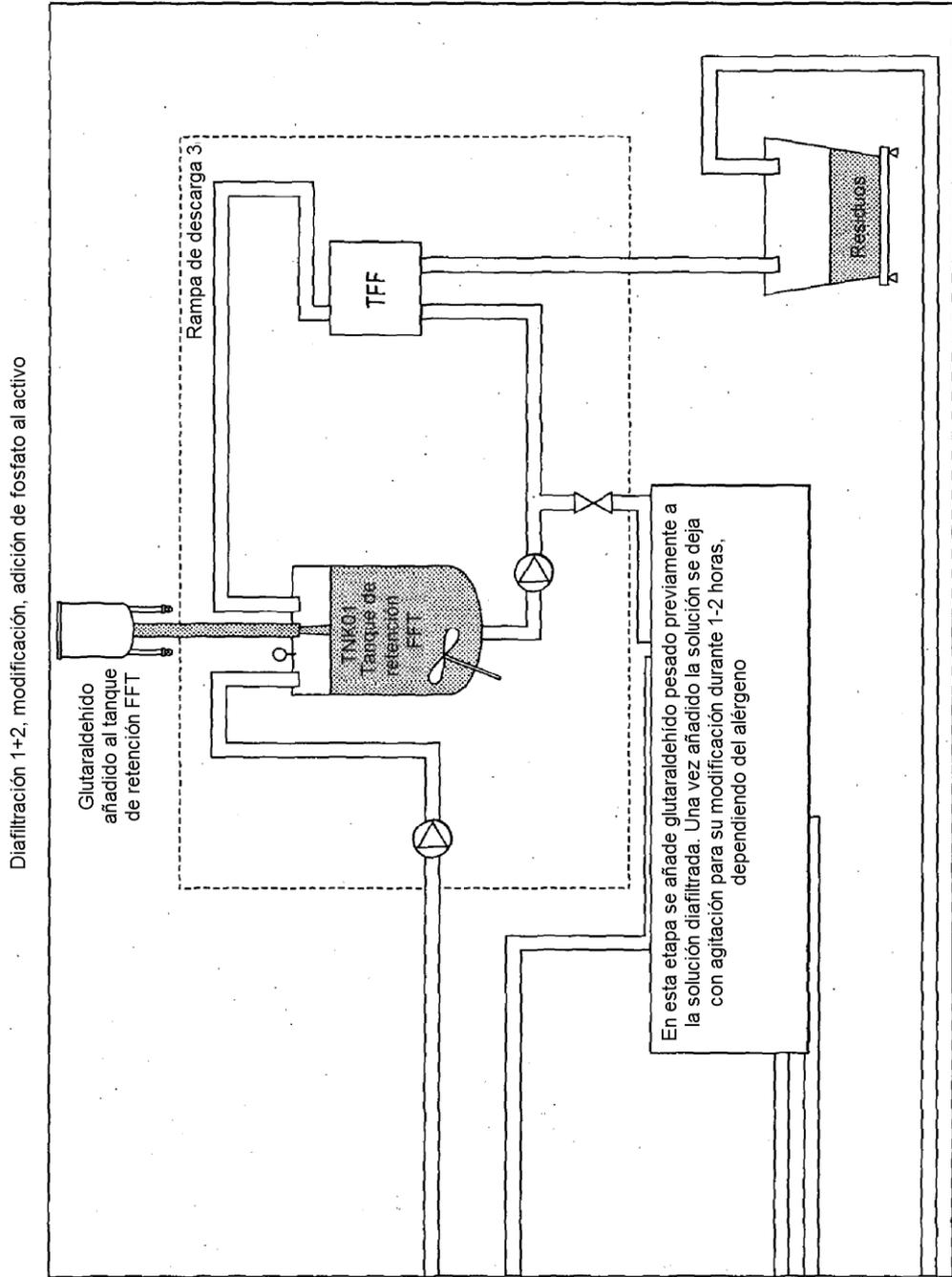


FIG. 5

Diafiltración 1+2, modificación, adición de fosfato al activo

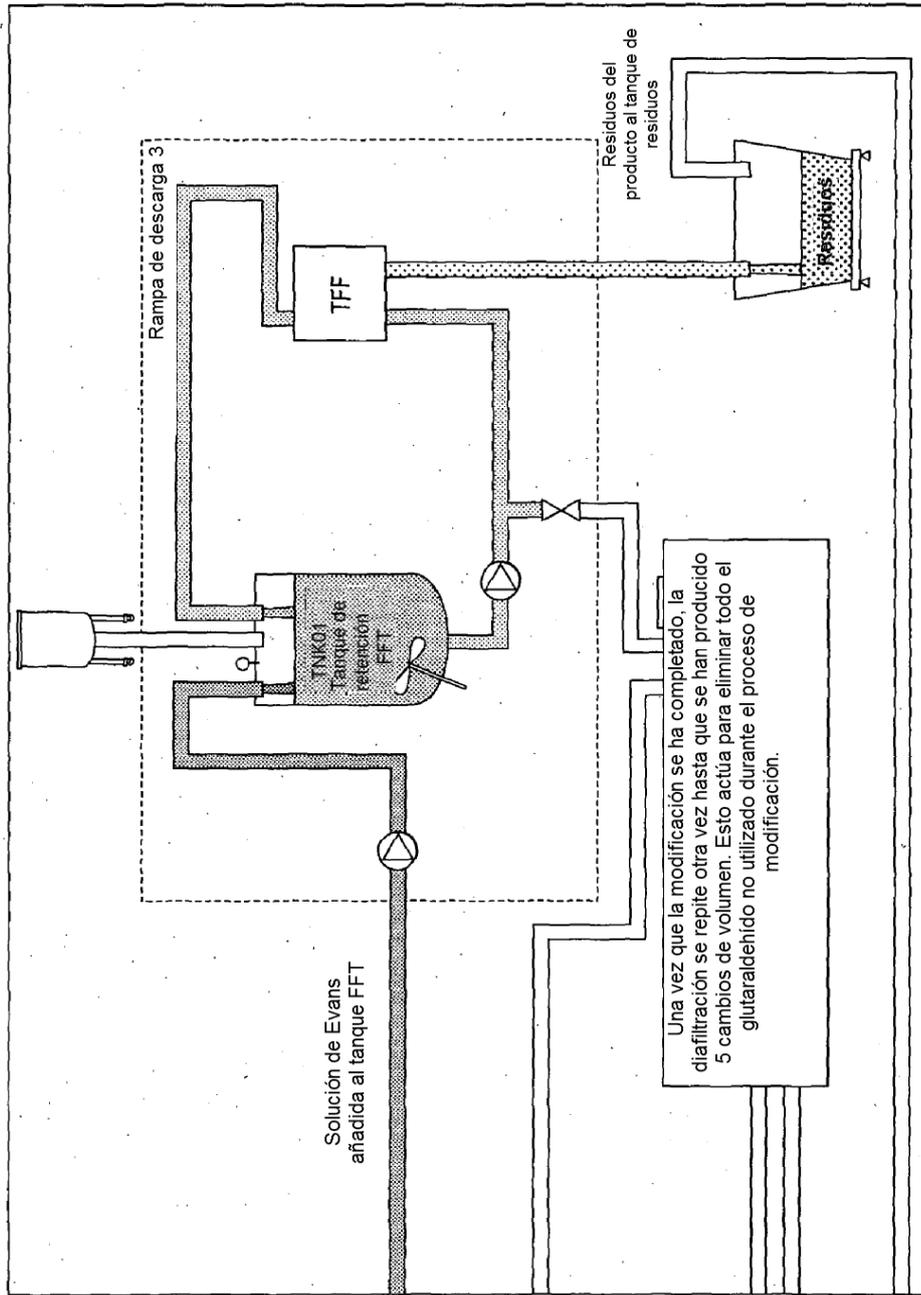


FIG. 6

Diafiltración 1+2, modificación, adición de fosfato al activo

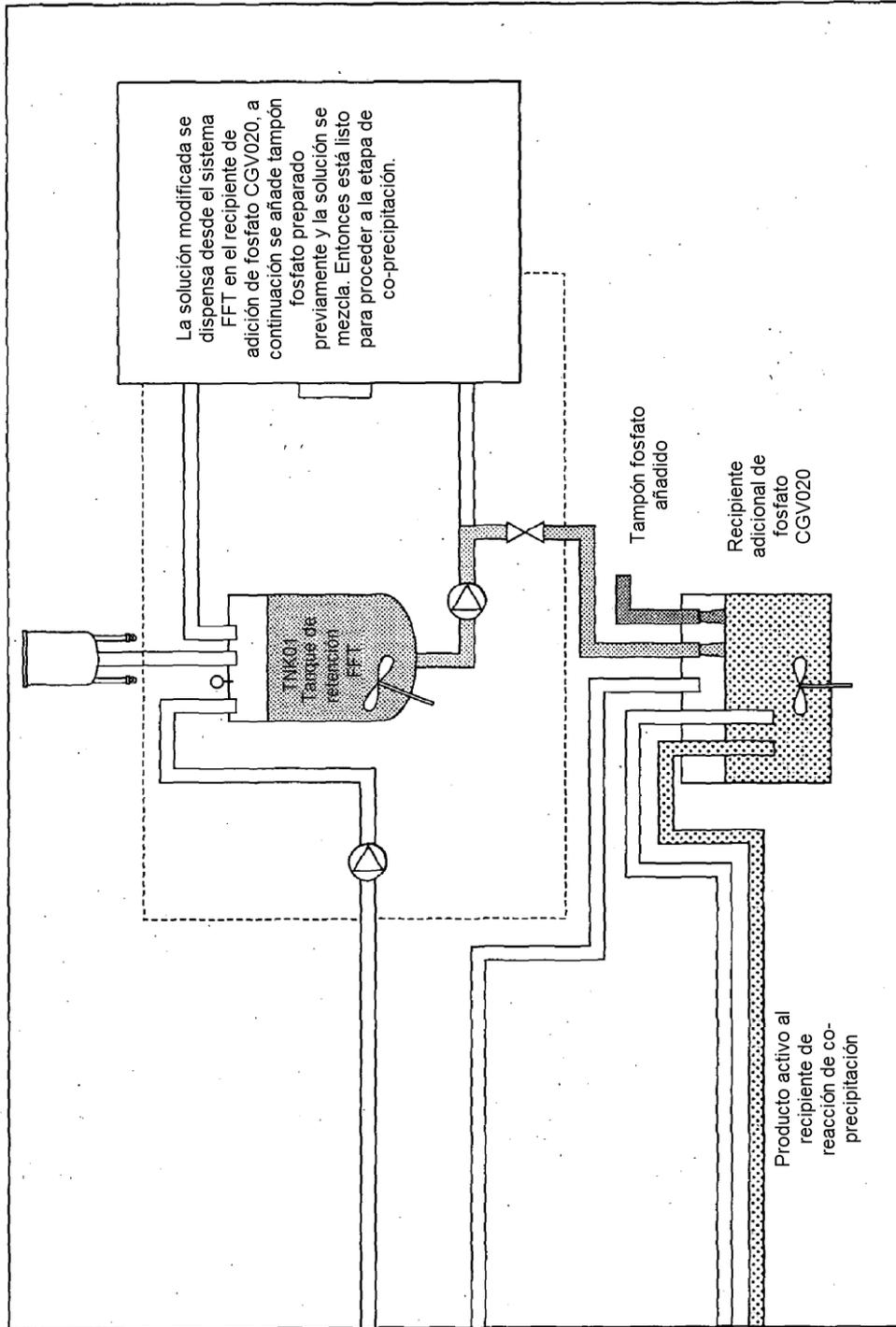


FIG. 7

Filtración estéril, co-precipitación y lavado del blanco y el producto activo

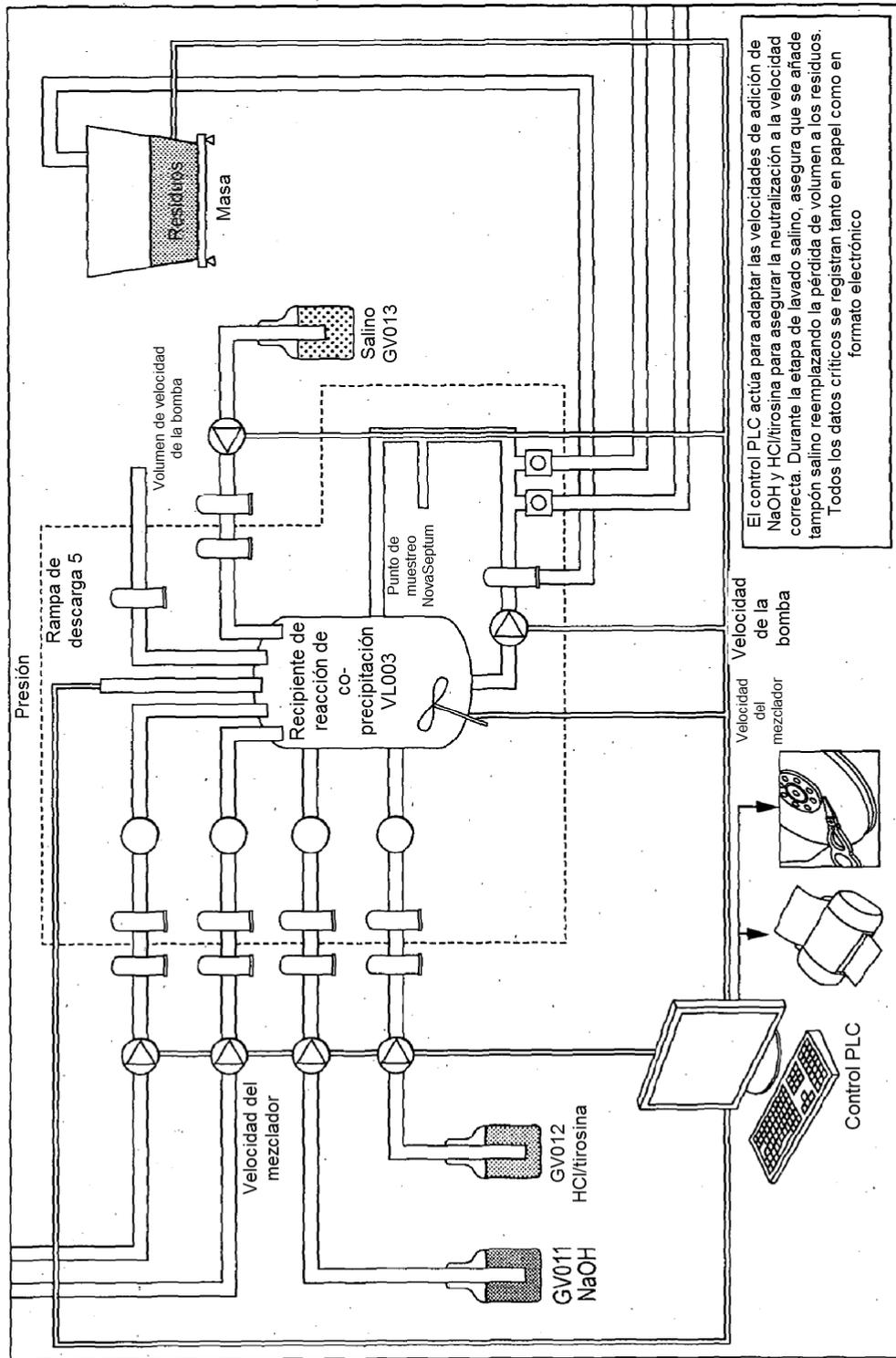


FIG. 8

Filtración estéril, co-precipitación y lavado del blanco y el producto activo

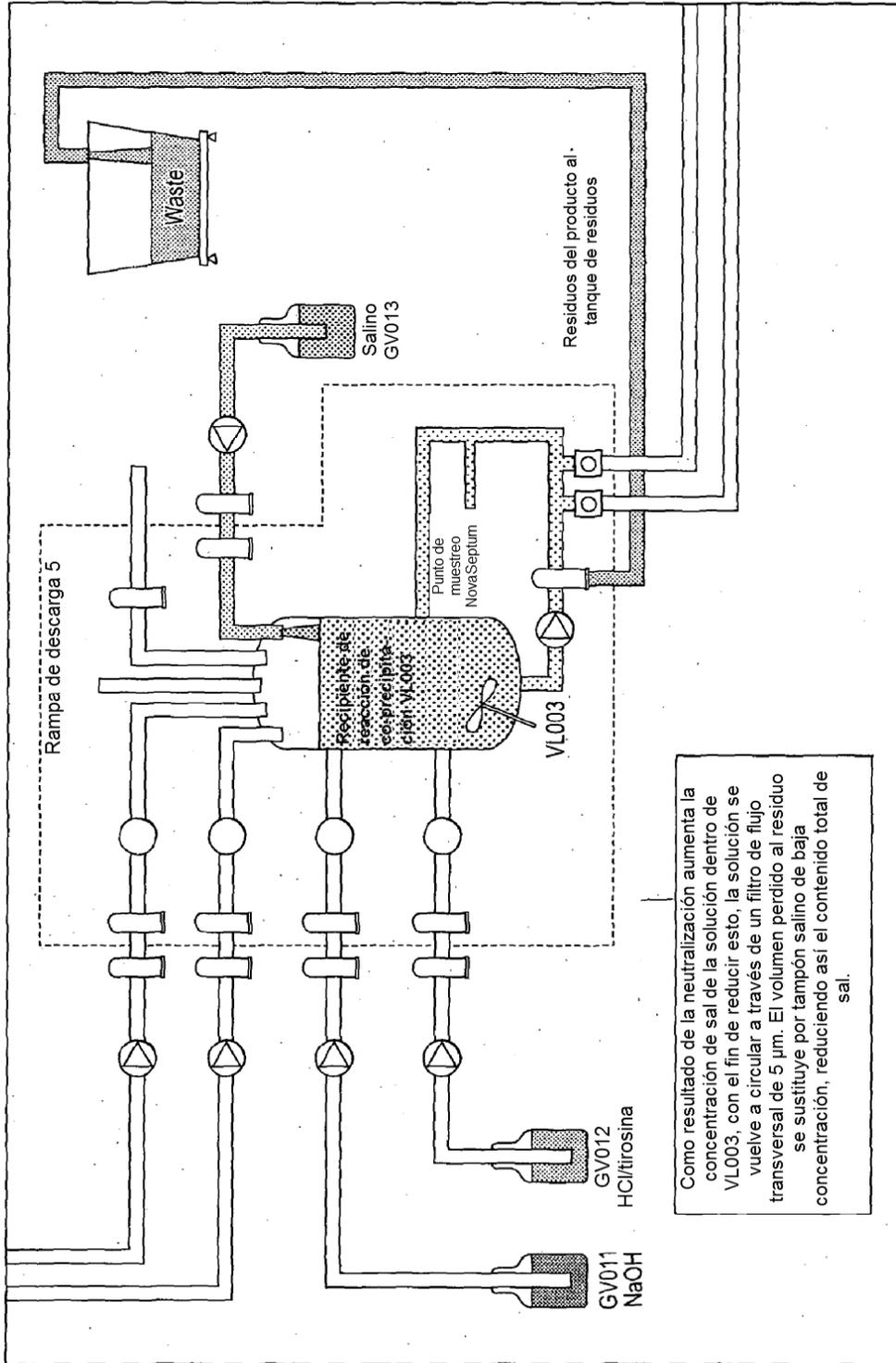


FIG. 9

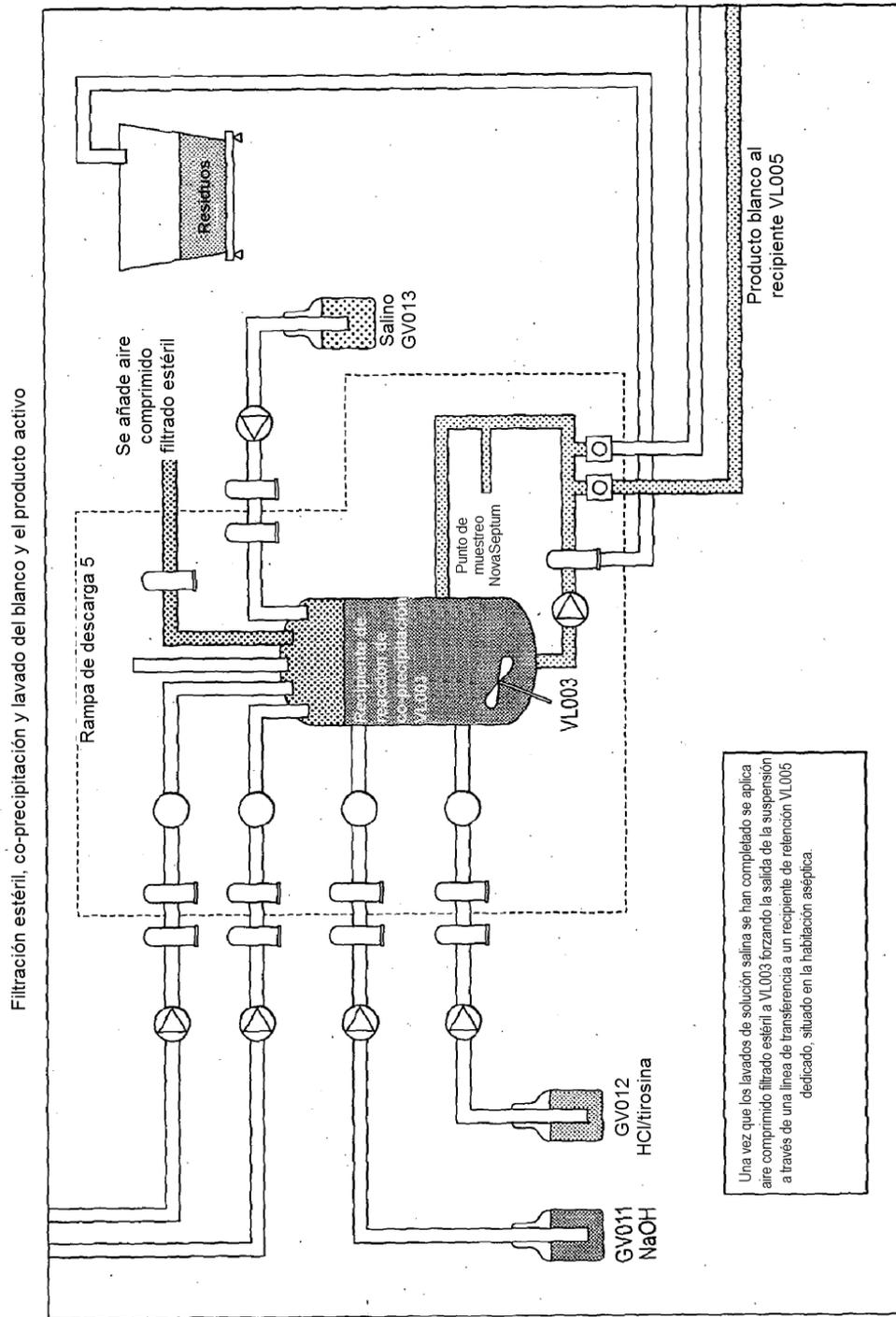


FIG. 10

Filtración estéril, co-precipitación y lavado del blanco y el producto activo

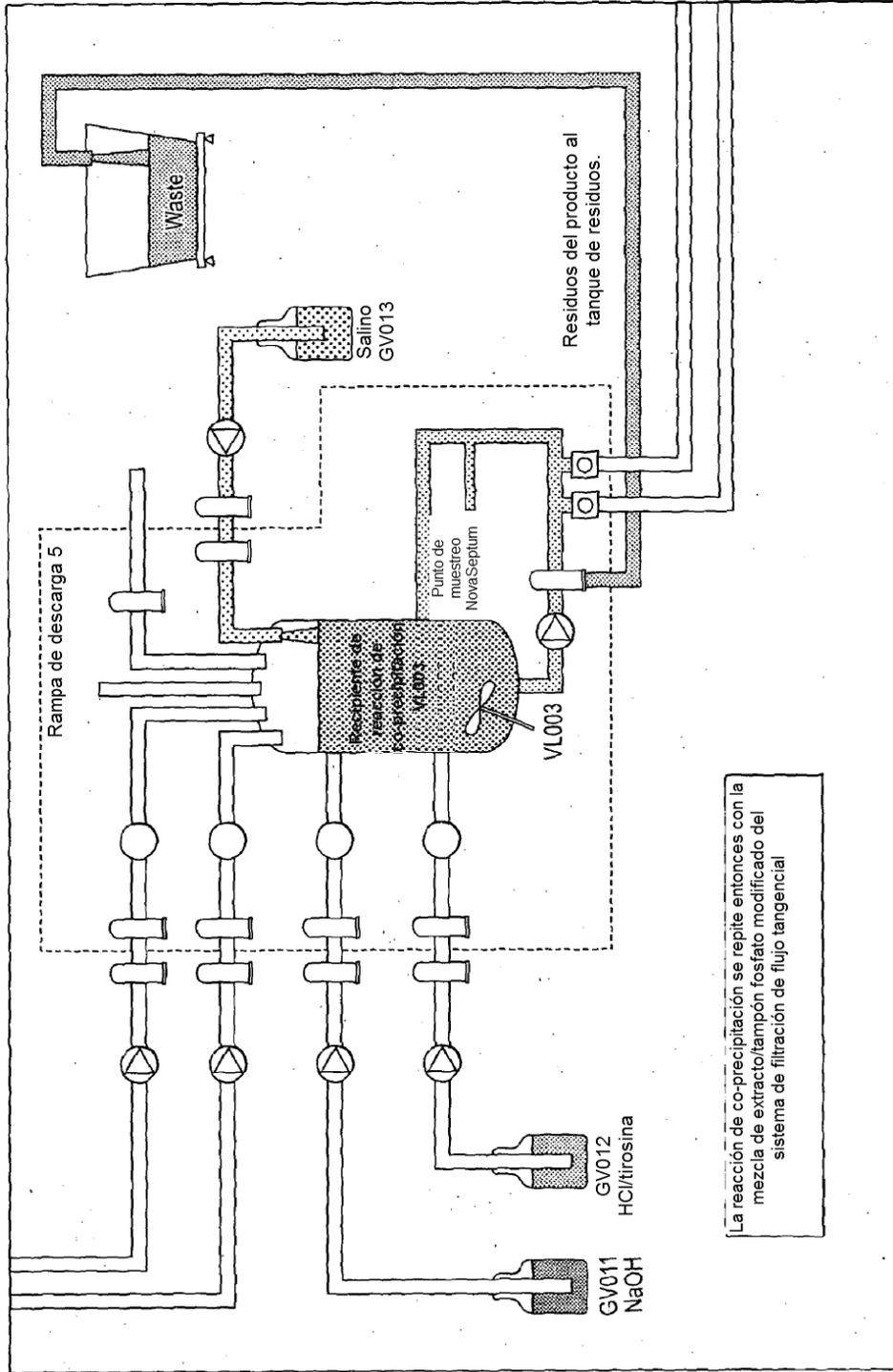


FIG. 11

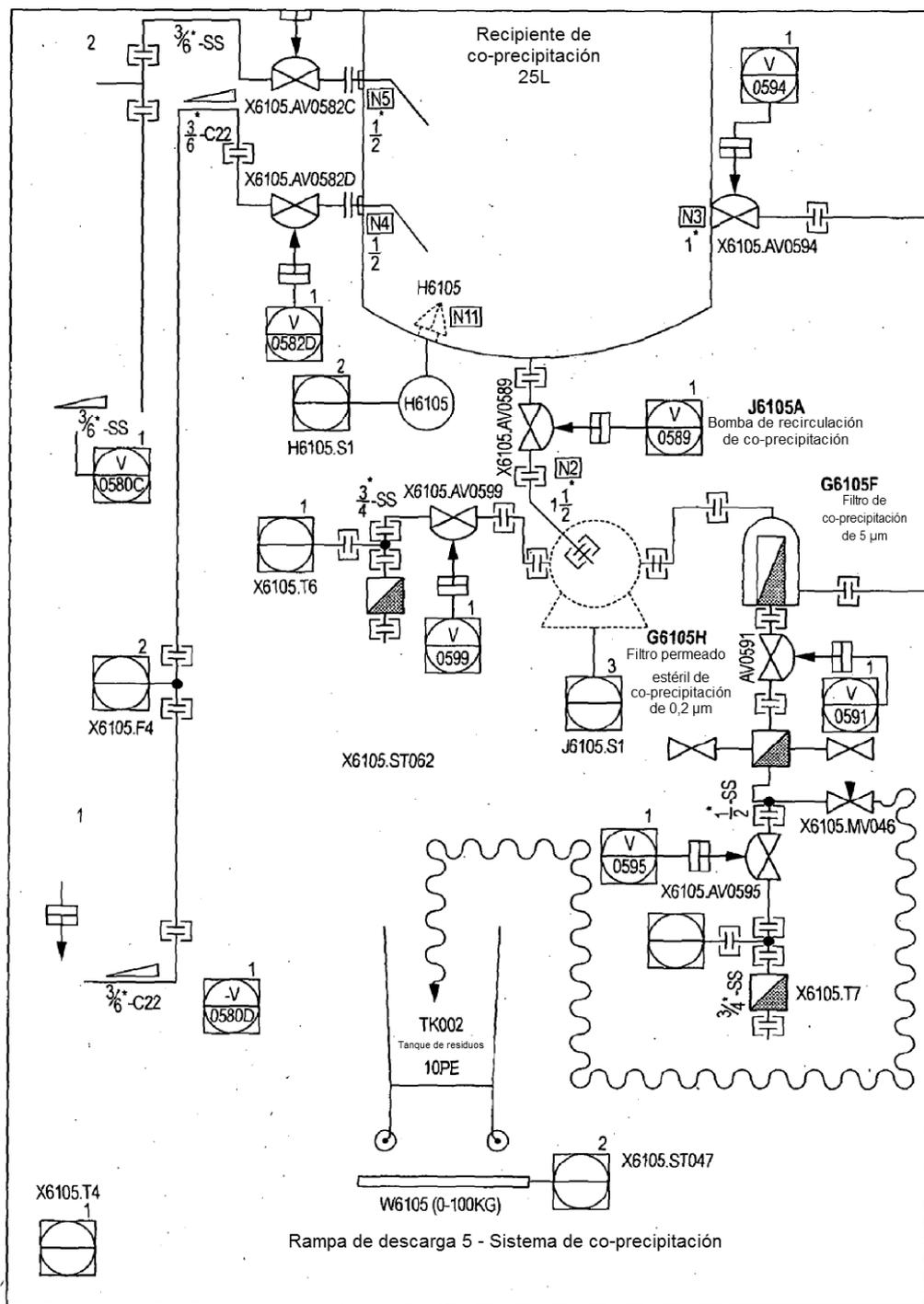


FIG. 12



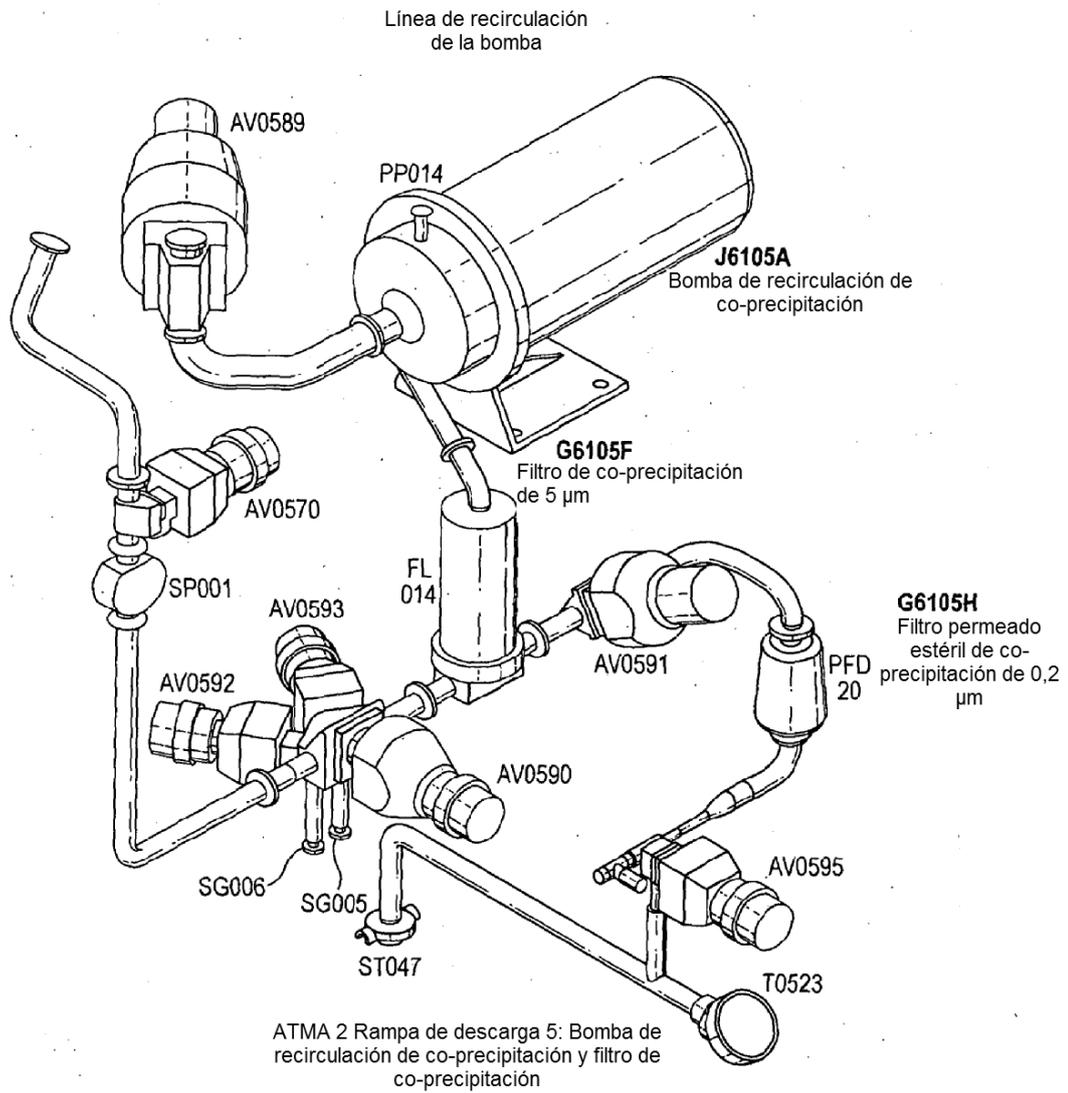


FIG. 13