



00 66606

SOLICITUD
TE I
NCION
Radicación : 0234666 0234666
Fecha (USD): 2009-09-05 13:31:47
Trámite : 692 PATENTES D 1 REGISTRADO/ 431 PRESENTAC
Dependencia: 2329 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 77

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

GERMAN CASTILLO GRAU

País de Domicilio

BELGICA

Departamento o Estado

Dirección

rue de l' Institut 89

Ciudad

RIXENSART

Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO PODER No. 16.769

Nombre

GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección y Domicilio

Carrera 13 No. 37-43, Piso 12

Ciudad

Santafé de Bogotá

Teléfono

2859828

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

Martine Anne Cecile WETTENDORF

Identificación

Dirección

Rixentart, Bélgica

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

NUEVA COMPOSICION

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☐

(33) País INGLESA

(32) Fecha Septiembre 7, 1999

(31) No. Solicitud

GB 9921147.6

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☐ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

A 61k39/42

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Se proporcionan nuevas composiciones de vacunas de combinación que comprenden un antígeno viral de la hepatitis B y un antígeno de HPV y además, opcionalmente uno o más de los siguientes componentes: un antígeno EBV, un antígeno de la hepatitis A o un virus atenuado inactivado, un antígeno viral del herpes simple, un antígeno de VZV, un antígeno de HCMV, un antígeno de Toxoplasma gondii. Las composiciones de vacuna se formulan con un coadyuvante que es un estimulador potencial de la respuesta de las células TH1 tal como el 3D-MPL y el QS21.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☒
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC	☒
Recibo de la tasa respectiva	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia de la primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista:	☒
Copia certificada de la primera solicitud:	☐
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción simple	☒
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☒
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms	☐
Otros Documentos	☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE GERMAN CASTILLO GRAU

CC. 17.017.671 Btá

T.P.No. 2978



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00000000 00000000
Fecha (REC): 2000-09-05 13:31:47 Folios: 77
Tramite : 032 PATENTES D 1 DEBISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 54,981
FECHA : SEPTIEMBRE 5 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
CASTILLO BRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	2883184	1,824,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50003-01-01 SOLICITUDES	1 TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
	TOTAL :	\$ 608,000.00

SOM: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

Nueva Composición

La presente invención se refiere a nuevas formulaciones de vacunas, procedimientos para su preparación y sus usos en terapias. En concreto la presente invención se refiere a la combinación de vacunas para su administración a adolescentes.

Los virus del Papiloma son pequeños virus tumorales de ADN que son especies altamente específicas. De hecho, se han descrito en torno a 70 especies individuales de genotipos de virus Papiloma humano (HPV). Los HPV son por lo general específicos bien para la piel (por ejemplo el HPV-1 y -2) o para las superficies mucosas (por ejemplo HPV-6 y -11) y normalmente causan tumores benignos (verrugas) que persisten durante varios meses o años. Tales tumores benignos pueden ser alarmantes para el individuo afectado pero, con unas pocas excepciones, no tienden a ser amenazantes para la vida.

Algunos HPV se asocian también a cánceres. La asociación fuertemente positiva entre un HPV y un cáncer humano es la que existe entre el HPV-16 y HPV-18 y el carcinoma cervical. El cáncer cervical es el mal más extendido en los países desarrollados, con cerca de 500.000 nuevos casos por año en el mundo. Ahora es técnicamente posible combatir activamente

5 K

las infecciones causadas por HPV-16 primario utilizando vacunas, incluso en el caso cánceres que presentan HPV-16. Para un repaso de los prescripciones para la vacunación profiláctica y terapéutica véase Cason J., Clin. Immunother, 5 1994; 1(4) 293-306 y Hagenessee M.E., Infections in Medicine 1997 14(7) 555-556, 559-564.

Hoy en día, los diferentes tipos de HPV se han aislado y caracterizado con la ayuda de los sistemas de clonación en 10 bacterias y más recientemente por ampliación por PCR. La organización molecular de los genomas HPV se ha definido en una base comparativa con los virus papiloma bovinos tipo I (BPV1) bien caracterizados.

15 Otros serotipos HPV de interés particular son 31, 33 y 45.

Aunque pueden tener lugar variaciones menores, todos los genomas de HPV descritos tienen al menos siete genes 20 tempranos, E1 a E7 y dos genes tardíos L1 y L2. Además, una región reguladora cadena arriba hospeda las secuencias reguladoras que controlan la mayoría de los sucesos de transcripción del genoma del HPV.

25 Los genes E1 y E2 están involucrados en la replicación

viral y el control transcripcional respectivamente y tienden a romperse por integración viral. Los E6 y E7 y según recientes evidencias también el E, están involucrados en la transformación viral.

5

En los HPV involucrados en el carcinoma cervical tal como HPV 16 y 18, el proceso oncogénico comienza después de la integración del ADN viral. La integración da lugar a la inactivación de los genes que codifican las proteínas de la cápsida L1 y L2 y a la instalación de una sobreexpresión continua de las dos proteínas tempranas E6 y E7 que llevarán a una pérdida gradual de la diferenciación celular normal y al desarrollo del carcinoma.

15 El carcinoma de la cérvix es común en mujeres y se desarrolla en una etapa intermedia al carcinoma invasivo que frecuentemente lleva a la muerte. Las etapas intermedias de la enfermedad se conocen como neoplasia intrapitelial cervical y se gradúa de I a III en términos de gravedad
20 creciente.

Clínicamente, la infección por HPV del tracto anogenital femenino se manifiesta como condilomas planos cervicales, el distintivo de estos es la coilocitosis que afecta
25 predominantemente a las células superficiales e intermedias

AN

del epitelio escamoso cervical.

Los coilocitos, que son consecuencia de un efecto citopático del virus, aparecen como células multinucleadas con un halo claro perinuclear. El epitelio se refuerza mediante la queratinización, responsable de la aparición verrugosa de la lesión.

Los citados condilomas planos, cuando son positivos para los serotipos de HPV 16 ó 18, son factores de alto riesgo para la evolución hacia la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) y el carcinoma in situ (CIS) que se consideran como lesiones precursoras del carcinoma invasivo de la cérvix.

El documento WO 96/19496 describe variaciones de las proteínas E6 y E7 del virus de papiloma humano, particularmente proteínas de fusión de E6/E7 con una supresión en ambas proteínas E6 y E7. Estas proteínas de fusión supresión se consideran inmunogénicas.

20

Las vacunas basadas en HPV L1 se describen en los documentos WO 94/00152, WO 94/20137, WO 93/02184 y WO 94/05792. Tal vacuna puede comprender el antígeno L1 como un monómero, un capsómero o una partícula vírica similar. Tales partículas pueden comprender adicionalmente proteínas L2. Las

vacunas basadas en L2 se describen por ejemplo en el documento WO 93/00436. Otras vacunas de HPV se basan en proteínas tempranas, tales como proteínas de fusión o E7 tal como la L2-E7.

5

Son bien conocidas las vacunas para la profilaxis de las infecciones por hepatitis B que comprenden uno o más antígenos de hepatitis B. Por ejemplo la vacuna Engerix-B (marca registrada) de Smithkline Beecham Biologicals se usa para prevenir la hepatitis B. Esta vacuna comprende un antígeno de superficie de la hepatitis B (específicamente el aminoácido 226 de S-antígeno descrito en Harford y col. en Postgraduate Medical Journal, 1987, 63 (Suplemento 2), pág 65-70) y se formula utilizando hidróxido de aluminio como

15 coadyuvante.

Existe una necesidad de vacunas de combinación eficaces para prevenir enfermedades en aquellos adolescentes que sean especialmente propensos.

20

La presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende:

- a) un antígeno de la hepatitis B viral (HBV); y
- 25 b) un antígeno del virus papiloma humano

en combinación con un coadyuvante que es un estimulador preferencial de la respuesta de células TH1.

La composición de vacuna de la presente invención es de gran interés para la administración a adolescentes que presenten un riesgo particular respecto a las infecciones por HBV y/o HPV.

Opcionalmente la composición de vacuna de la presente invención comprende adicionalmente uno o más de otros antígenos como se describe a continuación.

Se ha encontrado que la composición de vacuna de acuerdo con la presente invención no muestra sorprendentemente interferencia alguna, esto es, que la respuesta inmune a cada antígeno en la composición de la presente invención es esencialmente la misma que la obtenida por cada antígeno individualmente en combinación con un coadyuvante que es un estimulador preferencial de la respuesta de células TH1.

20

La vacuna Havrix (marca registrada), también de SmithKline Beecham Biologicals es un ejemplo de vacuna que puede utilizarse para prevenir las infecciones de la hepatitis A. Se formula con hidróxido de aluminio como coadyuvante. Esta vacuna comprende una cepa atenuada del

virus HM-175 de la hepatitis A inactivada con formol (formaldehído); véase Andre y col. (Prog. med. Virol., vol. 37, pág. 24).

5 Tal como se usa en el presente documento, el término antígeno de la hepatitis A viral (HAV) se usa para referirse a una proteína derivada del virus de la hepatitis A o a una cepa atenuada de HAV, opcionalmente inactivada, por ejemplo con formaldehído. Si el antígeno de HAV es una proteína
10 derivada del virus de la hepatitis A podría ser opcionalmente una proteína recombinante.

La vacuna Twinrix (marca registrada) es una combinación de un antígeno de la hepatitis B recombinante con el virus
15 de la hepatitis A atenuado e inactivado citado anteriormente. La vacuna podría usarse para proteger contra la hepatitis A y la hepatitis B simultáneamente.

La patente europea 0339667 (Chemo Sero) describe el
20 concepto general de combinación de un antígeno de la hepatitis A y un antígeno de la hepatitis B para preparar la vacuna de combinación. En esa memoria descriptiva se establece que el coadyuvante que se usa no es crítico: debería ser únicamente capaz de mejorar la actividad inmune
25 en una extensión deseada y no causar efectos secundarios. Se

establece que se pueden utilizar los geles de aluminio, en particular el gel de hidróxido de aluminio y el gel de fosfato de aluminio.

5 En un aspecto adicional la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende:

- a) un antígeno de la hepatitis B viral (HBV);
- b) un antígeno del virus del papiloma humano (HPV); y
- 10 c) un antígeno de la hepatitis A viral (HAV)

en combinación con un coadyuvante que es un estimulador preferencial de la respuesta de las células TH1.

15 La citada vacuna es muy beneficiosa para su administración a adolescentes con riesgo de infección por HBV, y/o HPV, y/o HAV.

Se puede dividir una respuesta inmune principalmente en
20 dos categorías extremas: una respuesta inmune mediada por células y una respuesta inmune humoral (tradicionalmente caracterizadas sus mecanismos de protección por anticuerpos y por un mecanismo efector celular respectivamente). Estas categorías de respuesta se han llamado respuestas tipo TH1
25 (respuesta mediada por células), y respuesta inmune tipo TH2

(respuesta humoral).

Las respuestas inmunes tipo TH-1 extremas pueden caracterizarse por la generación de un antígeno específico, 5 linfocitos T citotóxicos de haplotipo restringido, y respuestas de células asesinas naturales. Las respuestas inmunes tipo TH-1 en ratones se caracterizan frecuentemente por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en el ser humano, esto se corresponde con los anticuerpos 10 tipo IgG1. Las respuestas inmunes tipo TH-2 se caracterizan por la generación de un amplio intervalo de isotipos de la inmunoglobulina que incluyen en ratones el IgG1, IgA e IgM.

Se puede considerar que la fuerza conductora tras el 15 desarrollo de estos dos tipos de respuesta inmune son las citocinas. Los altos niveles de citocinas tipo TH1 tienden a favorecer la inducción de repuestas inmunes mediadas por células para los antígenos dados mientras que los altos niveles de citocinas tipo TH-2 tienden a favorecer la 20 inducción de respuestas inmunes humorales al antígeno.

La distinción entre respuesta inmunes tipo TH1 y TH2 no es absoluta. En realidad un individuo soportará una respuesta inmune que se describe como predominantemente TH1 o 25 predominantemente TH2. Sin embargo, es frecuente y

conveniente considerar las familias de citocinas en términos como los descritos en clones de células T de murine CD4+ve de Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology*, 7, pág. 145-173). Tradicionalmente las respuestas de tipo TH1 se asocian a la producción de respuestas inmunes de citocinas INF- γ y IL-2 por linfocitos T. Otras citocinas asociadas frecuente y directamente a la inducción de respuesta inmune tipo TH1 no las producen las células T, tal como las IL-12. Por contra, las respuestas tipo TH-2 se asocian a la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y al factor de necrosis tumoral β (TNF- β).

Se sabe que ciertos coadyuvantes de vacunas son particularmente adecuados para la estimulación de respuestas a citocinas, bien tipo TH1 bien tipo TH2. Tradicionalmente el mejor indicador del balance TH1:TH2 de la respuesta inmune después de una vacunación o infección incluye la medida directa de la producción de citocinas TH1 o TH2 por linfocitos in vitro después de la reestimulación con antígeno, y/o la medida (al menos en ratones) de la relación IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpo específico del antígeno.

De esta forma un coadyuvante tipo TH-1 es el que estimula las poblaciones de células T aisladas para producir altos niveles de citocinas tipo TH1 cuando se reestiman con antígeno in vitro, y el que induce la respuesta de la inmunoglobulina específica del antígeno asociada al isotipo tipo TH1.

Los coadyuvantes que son capaces de la estimulación preferencial de la respuesta de las células TH1 se describen en la solicitud de patente internacional n° WO 94/00153 y WO 95/17209.

El monofosforil-lípido A 3-desoxiacilado (3D-MPL) es uno de los citados coadyuvantes. Este se conoce a partir del documento GB 2220211 (Ribi). Químicamente se trata de una mezcla de monofosforil-lípido A 3-desoxiacilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas y lo comercializa Ribi Immunochem, Montana. Una forma preferida de monofosforil-lípido A 3-desoxiacilado se describe en la Patente Europea 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

Preferiblemente, las partículas de 3D-MPL son lo suficientemente pequeñas como para ser filtradas de forma estéril a través de una membrana de 0,22 micras (tal como se describe en la patente europea n° 0 689 454). El 3D-MPL

estará presente en el intervalo de 10 μg a 100 μg preferiblemente de 25 a 50 μg por dosis en la que el antígeno estará presente típicamente en el intervalo de 2 a 50 μg por dosis.

5

Otro coadyuvante preferido comprende el QS21, una fracción no tóxica purificada por HPLC derivada de la corteza de Quillaja Saponaria Molina. Opcionalmente esta puede mezclarse con monofosforil-lípido A 3-desoxiacilado (3D-MPL),
10 opcionalmente junto con un vehículo farmacéutico.

El procedimiento de producción del QS21 se describe en la patente de Estados Unidos n° 5.057.540

15 Las formulaciones de coadyuvantes no reactogénicas que contienen ~~QS21 se han descrito previamente (WO96/33739)~~. Tales formulaciones que comprende QS21 y colesterol han mostrado ser coadyuvantes de estimulación de TH1 adecuados cuando se formulan junto con el antígeno. De esta forma, las
20 composiciones de vacuna que forman parte de la presente invención pueden incluir una combinación de QS21 y colesterol.

Coadyuvantes adicionales que sean estimuladores
25 preferenciales de la respuesta de células TH1 incluyen

oligonucleótidos inmunomoduladores, por ejemplo secuencias de CpG no metiladas como se describe en el documento WO 96/02555.

5 Las combinaciones de diferentes coadyuvantes estimuladores de TH1, tal como las mencionadas anteriormente, se contemplan también como proveedora de un coadyuvante que sea un estimulador preferencial de la respuesta de células TH1.

10

Por ejemplo, el QS21 puede formularse junto al 3D-MPL. La relación de QS21:3D-MPL será típicamente del orden de 1:10 a 10:1; preferiblemente de 1:5 a 5:1 y frecuente y sustancialmente de 1:1. El intervalo preferido para una
15 sinergia óptima es de 2,5:1 a 1:1 (3D-MPL:QS21).

Preferiblemente está presente también un vehículo en la composición de la vacuna de acuerdo con la invención. El portador puede ser una emulsión de aceite en agua, una sal
20 de aluminio, tal como fosfato de aluminio o un hidróxido de aluminio.

Una emulsión de aceite en agua preferida comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, alfa tocoferol y
25 Tween 80. De forma adicional la emulsión aceite en agua puede

contener Span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

En un aspecto particularmente preferido el antígeno en la composición de vacuna de acuerdo con la presente invención
5 se combina con 3D-MPL y alumbre.

Típicamente para la administración a humanos el QS21 y el 3D-MPL estarán presentes en una vacuna en el intervalo de 1 μg a 200 μg , tal como 10-100 μg , preferiblemente de 10 μg -
10 50 μg por dosis. Típicamente el aceite en agua comprende de un 2 a un 10% de escualeno, de un 2 a un 10% de alfa tocoferol y de un 0,3 a un 3% de Tween 80. Preferiblemente la relación de escualeno:alfa tocoferol es igual o inferior a 1 ya que esto proporciona una emulsión estable. El Span 85
15 puede estar presente a un nivel de un 1%. En algunos casos puede ser ventajoso que la vacunas de la presente invención contengan además un estabilizador.

Las emulsiones de aceite en agua no tóxicas contienen
20 preferiblemente un aceite no tóxico, por ejemplo escualeno o un emulsionante, por ejemplo Tween 80, en un vehículo farmacéutico acuoso. EL vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina de fosfato tamponada.

25 Una formulación de coadyuvante particularmente potente

incluye QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua como se describe en el documento WO 95/17210.

El antígeno HPV en la composición de la invención se deriva preferiblemente de HPV 16 y/o 18, o de HPV 6 y/o 11, o HPV 31, 33 o 45.

En una realización preferida el antígeno HPV en la composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende la proteína de la cáspida principal L1 de HPV y opcionalmente la proteína L2, particularmente de HPV 16 y/o HPV 18. En esta realización, la forma preferida de la proteína L1 es una proteína L1 truncada. Preferiblemente la L1 está en forma de una partícula similar a virus (VLP). ~~La proteína L1 puede fusionarse a otra proteína HPV, en particular la E7 para formar una fusión L1-E7.~~ Se prefiere particularmente los VLP quiméricos que comprenden ~~L1-E o L1-L2-E.~~

En otra realización preferida, el antígeno HPV en la composición de la invención se deriva de una proteína ~~E6 o E7, en particular una proteína E6 o E7 unida a un patrón de fusión~~ inmunológico que presente epitopos de ~~células~~ T.

En una forma preferida de esta realización de la invención, el patrón de fusión inmunológico se deriva de

proteínas D de *Haemophilus influenza* B. Preferiblemente los derivados de proteínas D comprenden aproximadamente el primer tercio de la proteína, en particular aproximadamente los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales.

5

Las proteínas de fusión preferidas de esta realización de la presente invención comprenden proteína D-E6 a partir de HPV 16, proteína D-E7 a partir de HPV 16, proteína D-E7 a partir de HPV 18 y proteína D-E6 a partir de HPV 18. La parte de proteína D preferiblemente comprende el primer tercio de la proteína D.

ohg
inwv

En otra realización de la invención, el antígeno HPV está en forma de una fusión L2-E7, particularmente de HPV 6 y/o HPV 11.

Las proteínas de la presente invención se expresan preferiblemente en *E. coli*. En una realización preferida las proteínas se expresan con una cola de Histidina que comprende entre 5 y 9, y preferiblemente 6, residuos de Histidina. Estas son ventajosas en la purificación posterior. La descripción de la preparación de tales proteínas se describe completamente en la solicitud de patente del Reino Unido en trámite junto con la presente número: GB 9717953.5.

25

El antígeno HPV en la composición, de vacuna puede adsorberse sobre $Al(OH)_3$. Preferiblemente la VLP L1 se adsorbe sobre $Al(OH)_3$.

5 El antígeno viral de la hepatitis B (HBV) en la composición de la presente invención es típicamente el antígeno de superficie de la hepatitis B.

La preparación del antígeno de superficie de la
10 hepatitis B (HBsAg) es bien conocido. Véase por ejemplo, Harford y col. en Develop. Biol. Standard 54, página 125 (1983), Gregg y col. en Biotechnology, 5, pág 479 (1987), los documentos EP-A-0226846, EP-A-0229108 y las referencias ahí incluidas.

15

Como se usa en este documento, la expresión "antígeno de superficie de la hepatitis B", abreviado en el mismo como "HBsAg" o "HBS" incluye cualquier antígeno HBsAg o fragmento del mismo que muestra la antigenicidad del antígeno de
20 superficie HVB. Se entenderá que además de la secuencia de aminoácido 226 del antígeno HBsAg (véase Tiollais y otros. Nature, 317, 489 (1985) y las referencias de éste) el HBsAg descrito en este documento puede, si se desea, contener toda o una parte de una secuencia pre-S como se describe en las
25 referencias anteriores y en el documento EP-A-0 278 940. El

HBsAg tal como se describe en este documento también se puede referir a variantes, por ejemplo, el "mutante de escape" descrito en el documento WO 91/14703. En un aspecto adicional el HBsAg puede comprender una proteína descrita como L* en la Solicitud de Patente Europea Número 0 414 374, esto es, una proteína cuya secuencia de aminoácidos consta de partes de la secuencia de aminoácidos de la proteína grande (L) (tipo ad o ay) del virus de la hepatitis B, caracterizada porque la secuencia de aminoácidos de la proteína consta de:

10

(a): residuos 12-52, seguidos por los residuos 133-145, seguidos por los residuos 175-400 de la mencionada proteína L; o

(b): residuo 12, seguido por los residuos 14-52, seguidos por los residuos 133-145, seguidos por los residuos 175-400 de la mencionada proteína L.

20

El HBsAg también se puede referir a los polipéptidos descritos en los documentos EP 0 198 474 ó EP 0 304 578.

Normalmente, la HBsAg se encontrará en forma de partícula. Puede comprender a la proteína S sola o puede ser una partícula compuesta, por ejemplo (L*, S) en el que L* es como se definió anteriormente y S es la proteína-S del antígeno de superficie de la hepatitis B.

N
N

El HBsAg puede ser adsorbido sobre fosfato de aluminio como se describe en el documento WO93/24148.

Preferiblemente, el antígeno de la hepatitis B (HBV) 5 usado en la formulación de la invención es S-antígeno HBsAg tal como se usa en el producto comercial Engerix-B (Marca Registrada; SmithKline Beecham Biologicals).

Una vacuna que comprende al antígeno de superficie de 10 la hepatitis B junto con 3D-MPL, se describe en la Solicitud de Patente Europea 0 633 784.

Ahora se describirán ejemplos de antígenos de patógenos adicionales que se pueden incluir en la composición de 15 acuerdo con la invención.

El virus Epstein Barr (EBV), un miembro del grupo de virus del herpes, causa mononucleosis infecciosa como enfermedad primaria en los humanos. Predominantemente, ésta 20 afecta a niños o a adultos jóvenes. Más del 90% de la población adulta media se encuentra infectada por el EBV que persiste durante toda la vida en los linfocitos-B periféricos. El virus es producido durante toda la vida de la persona en la glándula parótida y se contagia 25 principalmente por el intercambio de saliva entre los

27

individuos que difunden el virus. Los niños infectados con el EBV se muestran asintomáticos durante un largo período de tiempo o tienen unos síntomas muy leves, mientras que los adolescentes y los adultos que son infectados, desarrollan una mononucleosis infecciosa típica, caracterizada por fiebre, faringitis y adenopatía. Las personas que han sido infectadas mantienen anticuerpos anti-EBV durante el resto de su vida, y de esta forma son inmunes a infecciones posteriores.

10

Además de sus cualidades infecciosas, se ha mostrado que el EBV transforma los linfocitos en células que se dividen rápidamente y por tanto está implicado en varios linfomas diferentes, incluyendo el linfoma Burkitts (BL) africano. El EBV también puede estar implicado en el origen del carcinoma nasofaríngeo (NPC). Se estima en todo el mundo que se producen 80.000 casos de carcinoma nasofaríngeo y prevalece más en las poblaciones de etnia china. La mononucleosis infecciosa es una consecuencia de infección primaria por el EBV. No es una enfermedad de tratamiento de por vida si están ausentes factores de riesgo adicionales.

Se han descrito cuatro proteínas de la envuelta viral que constituyen el así denominado complejo antígeno de la membrana. Normalmente se las conoce como gp 220/350 o gp

24

250/350 o simplemente como gp 250 ó 350 (véase el documento EP-A-151079). Existe certeza convincente de que la gp 350 y la gp 250 inducen la producción de anticuerpos neutralizantes y esos anticuerpos frente a la gp 350 y a la gp 250 tienen una capacidad de neutralización. Estas proteínas son de esta forma candidatas para una posible vacuna EBV. Para más información sobre la aplicación de gp 250/350 para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el EBV, véase el documento EP 0 173 254.

10

La principal glicoproteína de superficie del EBV gp350/220 infecta a las células diana humanas mediante la interacción con la proteína de la membrana celular, CD21. La gp350/220 es el objetivo primario para los anticuerpos de neutralización del EBV en humanos y algunas formas de gp350/220 se ha demostrado que protegen frente a la enfermedad relacionada con el EBV. Preferiblemente, una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende gp350 de EBV aunque se pueden usar otros antígenos protectores.

20

El HSV-2 es el agente etiológico primario del herpes genital. El HSV-2 y el HSV-1 (el agente causante del herpes labial) se caracterizan por su capacidad tanto para inducir enfermedades agudas como para establecer una infección

25

latente, principalmente en las células de los ganglios neuronales.

Se estima que el herpes genital lo padecen 5 millones de personas en los Estados Unidos solamente con 500.000 casos clínicos registrados cada año (infección primaria e infección recurrente). La infección primaria se produce típicamente después de la pubertad y se caracteriza por la aparición localizada de lesiones dolorosas en la piel, que persisten durante un período de 2 a 3 semanas. Dentro de los siguientes seis meses después de la infección primaria, el 50% de los pacientes experimentan una reaparición de la enfermedad. Cerca del 25% de los pacientes pueden experimentar de 10 a 15 episodios recurrentes de la enfermedad cada año. En pacientes inmunodeficientes la incidencia de una alta frecuencia de reaparición es estadísticamente más alta que en la población de pacientes normales.

Tanto los virus HSV-1 y HSV-2 tienen varios componentes de glicoproteína localizados en la superficie del virus. Se les conoce como gB, gC, gD, gE etc.

Cuando se incluye un antígeno HSV en la composición de la invención, éste es preferiblemente derivado del HSV-2, típicamente la glicoproteína D. La glicoproteína D se

encuentra en la membrana viral, y también se encuentra en el citoplasma de las células infectadas (Eisemberg R. J. y otros; J of Virol 1980, 35, 428-435). Comprende 393 aminoácidos incluyendo un péptido de señal y tiene un peso molecular de aproximadamente 60 kD. De todas las glicoproteínas de la envuelta del HSV, ésta es probablemente la mejor caracterizada (Cohen y otros; J. of Virology, 60, 157-166). In vivo se sabe que juega un papel central en la unión viral a las membranas de las células. Más aún, la glicoproteína D ha demostrado ser capaz de provocar anticuerpos neutralizantes in vivo (Eing y otros J. Med. Virology 127: 59-65). Sin embargo, el virus latente HSV-2 puede ser reactivado aún e inducir la reaparición de la enfermedad a pesar de la presencia de una alta proporción de anticuerpos neutralizantes en el suero del paciente.

En una realización de la invención, se encuentra presente una glicoproteína D truncada del HSV-2 de 308 aminoácidos que comprende los aminoácidos del 1 al 306 de la glicoproteína natural con la adición de Asparagina y Glutamina en el extremo terminal C de la proteína truncada desprovista de su región de anclaje a la membrana. Esta forma de la proteína incluye el péptido de señal que se escinde para producir una proteína madura de 283 aminoácidos. La producción de dicha proteína en las células de ovario de

Hamster chinos se ha descrito en la patente europea de Genetech EP-B-139 417.

La glicoproteína D truncada del HSV-2 madura
5 recombinante se usa preferiblemente en las formulaciones de vacunas de la presente invención y está designada como rgD2r.

Una combinación de este antígeno HSV-2 en combinación con el coadyuvante 3D-MPL se ha descrito en el documento WO
10 92/16231.

En un aspecto preferido la composición de vacuna de la invención comprende además un antígeno viral de la Varicela Zoster (antígeno VZV). Los antígenos adecuados del VZV para
15 su inclusión en la formulación de vacuna incluyen el gpI-V descrito por Longnecker y col., Proc. Natl. Acad Sci USA 84, 4303-4307 (1987).

En una realización preferida se usa gpI (véase Ellis y
20 col., patente de Estados Unidos 4.769.239). Véase también la patente europea n° 0405867 B1.

En otro aspecto preferido, la composición de vacuna de la invención comprende adicionalmente un antígeno del
25 citomegalovirus humano (HCMV). El HCMV es un virus de ADN

humano que proviene de la familia de los virus del herpes. El HCMV es endémico en la mayoría de las partes del mundo. El HCMV es responsable de graves afecciones médicas. El HCMV es la causa principal de defectos congénitos en los recién nacidos. La segunda población de riesgo son los pacientes inmunodeficientes tales como los que sufren de infección por HIV y aquellos pacientes que sufrieron trasplantes. La enfermedad clínica causa una variedad de síntomas que incluyen fiebre, hepatitis, neumonitis y mononucleosis infecciosa. Un antígeno preferido para su uso en una vacuna contra el HCMV es el gB685** como se describe en el documento WO 95/31555. Los inmunógenos para su uso en vacunas contra HCMV los proporciona también el pp65, una proteína de matriz de HCMV como se describe en el documento WO 94/00150 (Ciudad de la Esperanza).

En un aspecto preferido la composición de vacuna de la invención comprende de forma adicional ambos antígenos un ZVZ y un HCMV, en particular aquellos antígenos descritos anteriormente.

En otro aspecto preferido de la invención, la composición de vacuna de la invención comprende adicionalmente un antígeno de *Toxoplasma gondii*. El *Toxoplasma gondii* es un parásito protozoo estrictamente

intracelular responsable de la toxoplasmosis en animales de sangre caliente, incluyendo el hombre. Aunque es por lo general clínicamente asintomático en individuos saludables, la toxoplasmosis puede causar complicaciones graves en mujeres embarazadas y pacientes inmunodeficientes. Un antígeno preferido para su uso en vacunas contra *Toxoplasma gondii* es el SAG1 (también conocido como P30) como se describe en el documento WO 96/02624 o Tg34 como se describe en el documento WO 92/11366.

10

En un aspecto preferido, la composición de vacuna de la invención comprende además un antígeno VZV o un antígeno HCMV combinado con un antígeno *Toxoplasma gondii*, en particular aquellos antígenos descritos anteriormente.

15

En un aspecto preferido, la composición de vacuna de la invención es una vacuna multivalente, por ejemplo una vacuna tetra-o pentavalente.

20

Las formulaciones de la presente invención son muy eficaces en la inducción de inmunidad protectora, incluso con dosis muy bajas de antígeno (por ejemplo del orden de 5 µg de rgD2t).

25

Estas formulaciones proporcionan una protección

excelente contra infecciones primarias y estimulan ventajosamente respuestas inmunes específicas humorales (neutralización por anticuerpos) y también respuestas inmunes mediadas por células efectoras.

5

La presente invención en un aspecto adicional proporciona una formulación de vacuna tal como se describe en el presente documento para su uso en terapia médica, particularmente para su uso en el tratamiento o profilaxis
10 de infecciones del virus del papiloma humano e infecciones por virus de la hepatitis B.

La vacuna de la presente invención contendrá una cantidad inmunoprotectora de antígenos y se preparará por
15 técnicas convencionales.

La preparación de la vacuna se describe de modo general en Pharmaceutical Biotechnology, vol 61 Vaccine Design- the subunit and adjuvant approach, editado por Powell y Newman,
20 Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, USA 1978. La encapsulación en liposomas la describe, por ejemplo, en Fullerton, patente de Estados Unidos 4.235.877. La conjugación de proteínas para formar
25 macromoléculas se describe por ejemplo, en Likhite, patente

de Estados Unidos 4.372.945 y en Armor y col., patente de Estados Unidos 4.474.757.

La cantidad de proteína en cada dosis de vacuna se
5 selecciona como una cantidad que incluye una respuesta
inmunoprotectora sin significantes efectos secundarios
adversos en las vacunas típicas. Tal cantidad dependerá del
inmunogen específico que se emplee. Por lo general, se espera
que cada dosis comprenda 1-1000 μ de proteína,
10 preferiblemente 2-100 μ , más preferiblemente 4-40 μ . Una
cantidad óptima para una vacuna determinada puede obtenerse
mediante estudios convencionales que implican la observación
de valoraciones de anticuerpos y otras respuestas en
sujetos. Seguidamente a la vacunación inicial, los sujetos
15 pueden recibir una vacunación de recuerdo en aproximadamente
4 semanas.

Además de la vacunación de personas susceptibles a
infecciones por HPV o HBV, las composiciones farmacéuticas
20 de la presente invención pueden usarse para tratar
inmunoterapéuticamente, pacientes que sufren las citadas
infecciones virales.

En un aspecto adicional de la presente invención se
25 proporciona un procedimiento de obtención tal como se

describe en el presente documento, procedimiento que comprende una mezcla de un antígeno del virus del papiloma humano y un antígeno del virus de la hepatitis B con un coadyuvante inductor de TH-1, por ejemplo 3D-MPL y, 5 preferiblemente, un vehículo, por ejemplo alumbre.

Si se desea se pueden añadir otros antígenos en cualquier orden que convenga para proporcionar composiciones de vacunas multivalentes como se describe en el presente 10 documento.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención pero sin limitarla.

Ejemplo 1: Inmunogenicidad comparativa de HPV Ags/HBs combinados formulada con Alumbre/3D-MPL

INTRODUCCIÓN

5

Se llevó a cabo un estudio de inmunogenicidad en ratones Balb/C utilizando cuatro antígenos distintos:

1. Partícula similar a virus HPV 16 L1 (VPL-16)

10

2. Partícula similar a virus HPV 18 L1 (VLP-18)

M
M

30

3. PD 1/3 16E7 2M a partir de HPV-16 (E7)

4. HBsAg

5 formulados con Alumbre/3D-MPL (AS04) utilizando un volumen único de antígeno preadsorbido o 3D-MPL sobre Al(OH)₃ o AlPO₄.

Las formulaciones 3D-MPL/Al(OH)₃ se denotan como AS04D, mientras que las formulaciones basadas en 3D-MPL/AlPO₄ se 10 denotan como AS04C.

Se han ensayado las siguientes vacunas:

1. VLP16 + VLP 18 AS04D;

15

2. Formulaciones basadas en E7,

3. HBs AS04C

20 y se evaluó el potencial para combinar estas vacunas.

El objetivo de este experimento fue el siguiente:

1) Comparar la inmunogenicidad de distintas combinaciones 25 AS04 | de VLP16 + VLP18 o de E7 y HBs Ag.

34

2) Cuando las vacunas monovalentes se formulan en AS04C o AS04D:

Comparar la inmunogenicidad de diferentes formulaciones
5 de HBs AS04 preparadas a partir de AlPO_4 o de una mezcla de $\text{AlPO}_4/\text{Al}(\text{OH})_3$, con diferentes relaciones de formas de Alumbre; y

Evaluar el efecto de la adsorción de 3D-MPL sobre una
10 fracción de $\text{Al}(\text{OH})_3$, y AlPO_4 frente a 3D-MPL / $\text{Al}(\text{OH})_3$, en combinación con antígenos que contengan VLPs o E7.

El protocolo experimental se describe completamente en la sección de Materiales y Procedimientos.

15

En resumen, se inmunizaron intramuscularmente grupos de
10 ratones dos veces a intervalos de tres semanas con varias formulaciones basadas en Ag (1/10HD). La respuesta de los anticuerpos a HBs, E7 y VLPs Ag y el perfil isotópico
20 inducido por la vacunación se registraron por ELISA en el día 14 post II. AL mismo tiempo, la respuesta CMI (respuesta linfoproliferativa o la producción de citocinas ($\text{IFN}\gamma/\text{IL5}$)) se analizó después de la reestimulación *in vitro* de células esplénicas con antígenos HBs, VLPs o E7.

25

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Formulaciones

5 Composición de formulaciones

VLP16, VLP18, PD1/3-HPV16E7-His, y HBs sobre AS04C o AS04D.

Componentes utilizados

10

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>	<u>Tampón</u>
HPV 16 VLP	560 µg/ml	Tris 20 mM/NaCl 500 mM
HPV 18 VLP	550 µg/ml	NaCl 500 mM/NaPO ₄ 20 mM
AL(OH) ₃	10380 µg/ml	H ₂ O
PD1/3-HPV 16 E7-His	1170 µg/ml	PO ₄ 20 mM
HBs	1219 µg/ml	PO ₄ 10 mM/NaCl 150 mM
3D-MPL	1170 µg/ml	Agua para inyección
AlPO ₄	5 mg/ml	NaCl 150 mM

15

Adsorción

a) Adsorción de VLP.

5 Se ajustan volúmenes purificados de VLP 16 y VLP 18 a 500 $\mu\text{g/ml}$ con el tampón de purificación, luego se añade $\text{Al}(\text{OH})_3$ a razón de 2 μg de VLP/10 μg $\text{Al}(\text{OH})_3$. Se agita magnéticamente durante 60 minutos a temperatura ambiente y la mezcla se almacena a una temperatura de entre 2 y 8°C hasta la
10 formulación final.

b) Adsorción de Hbs.

Se mezclan 2 μg de Hbs con 40 μg de AlPO_4 . Se agita
15 magnéticamente durante 60 minutos a temperatura ambiente y la mezcla se almacena a una temperatura de entre 2 y 8°C hasta la formulación final.

Se mezclan 2 μg de Hbs con 10 μg de AlPO_4 . Se agita magnéticamente durante 60 minutos a temperatura ambiente y
20 la mezcla se almacena a una temperatura de entre 2 y 8°C hasta la formulación final.

c) Adsorción de PD1/3-HPV16E7-His.

25 Se mezclan 2 μg de E7 con 10 μg de $\text{Al}(\text{OH})_3$. Se agita

magnéticamente durante 60 minutos a temperatura ambiente y la mezcla se almacena a una temperatura de entre 2 y 8°C hasta la formulación final.

5 d) Adsorción de 3D-MPL.

Se mezclan 5 µg de 3D-MPL con 10 µg de Al(OH)₃. Se agita magnéticamente durante 60 minutos a temperatura ambiente y la mezcla se almacena a una temperatura de entre 2 y 8°C hasta la formulación final.

10

Se mezclan 5 µg de 3D-MPL con 10 µg de AlPO₄. Se agita magnéticamente durante 60 minutos a temperatura ambiente y la mezcla se almacena a una temperatura de entre 2 y 8°C hasta la formulación final.

15

Se mezclan 2,5 µg de 3D-MPL con 5 µg de Al(OH)₃. Se agita magnéticamente durante 60 minutos a temperatura ambiente y la mezcla se almacena a una temperatura de entre 2 y 8°C hasta la formulación final.

20

Se mezclan 2,5 µg de 3D-MPL con 5 µg de AlPO₄. Se agita magnéticamente durante 60 minutos a temperatura ambiente y la mezcla se almacena a una temperatura de entre 2 y 8°C hasta la formulación final.

25

”,

38

Formulación

Se mezclan H₂O y NaCl (concentrado x 10) y después de 10 minutos de agitación a temperatura ambiente se añaden los 5 diferentes componentes: antígeno adsorbido, 3D-MPL adsorbido y Al(OH)₃ (véase tabla 6). Se agitan a temperatura ambiente durante 10 minutos y se almacenan a 4°C hasta la inyección. Se puede llevar a cabo la caracterización in vitro de la formulación.

10

Tabla 6: ~~Grupos y detalles de las formulaciones~~

No está la pD1/3-HPV
16E7 His.

15

	Antígeno(s)		Inmunoestimulantes		Vehículo	
Grupo	Tipo	µg	Tipo	µg	Tipo	µg
A	VPL16	2	3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
	VLP18	2			Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	10
						20
B	HPV16E7	2	3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	10
						30

39

C	HBs , 2	3D-MPL 5	40 10
D	HBs 2	3D-MPL 5	Al (PO) ₄ 10 10 Al (OH) ₃ 30
E	HBs 2	3D-MPL 5	Al (PO) ₄ 10 Al (OH) ₃ 10 Al (OH) ₃ 30
F	E7 2 HBs 2	3D-MPL 5	Al (OH) ₃ 10 10 Al (OH) ₃ 10 Al (OH) ₃ 20
G	VLP16 2 VLP18 2 HBs 2	3D-MPL 5	Al (OH) ₃ 10 Al (OH) ₃ 10 10 Al (OH) ₃ 10 Al (OH) ₃ 10

5

H	VLP16	2		Al (OH) ₃	10	
	VLP18	2		AlPO ₄	10	
	HBs	2		Al (PO) ₃	10	
			3D-MPL	2, 5	Al (OH) ₃	5
			3D-MPL	2, 5		5
					Al (OH) ₃	10

No hay Ag
Hep A.

Serología de los ratones

5 Serología anti-HBs

La cuanficación de los anticuerpos anti-HBs se llevó a cabo por ELISA utilizando HBs (Hep 286) como antígeno de recubrimiento. Las soluciones de antígeno y anticuerpo se usaron a 50 µl por pocillo. El antígeno se diluyó hasta una concentración final de 1 µg/ml en PBS y se adsorbió durante la noche a 4°C en los pocillos de unas placas de microensayo de 96 pocillos (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dinamarca). Las placas se incubaron durante una hora a 37°C con PBS que contenía un 1% de albúmina de suero bovino y Tween 20 al 0,1% (tampón de saturación). Se añadieron diluciones a la mitad de suero (inicialmente con dilución 1/100) en el tampón de saturación a las placas recubiertas de HBs e incubadas durante una hora y 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS y Tween 20 al 0,1% y se añadió Ig anti-

ratón conjugado con biotina (Amersham, Reino Unido) diluido a 1/1500 o IgG1, IgG2A, IgG2b (IMTECH, Estados Unidos) diluidos a 1/4000, 1/8000, 1/4000 respectivamente en tampón de saturación a cada pocillo y se incubó durante una hora y 5 30 minutos a 37°C. Después de la etapa de lavado se añadió complejo de peroxidasa estreptavidina-biotinilada (Amersham, Reino Unido) diluido a 1/1000 en tampón de saturación durante 30 minutos más a 37°C. Las placas se lavaron como se explicó anteriormente y se incubaron durante 20 minutos con una 10 solución de o-fenilendiamina (Sigma) al 0,04%, H₂O₂ al 0,03% en 0,1% de Tween 20 y tampón de citrato 0,05 M a pH 4,5. La reacción se inactivó con H₂SO₄ 2N y se analizó a 490/630 nm. Se calcularon los títulos ELISA a partir de un estándar de SoftmaxPro (utilizando una ecuación de cuatro parámetros) y 15 expresado en EU/ml.

Serología anti-E7

20 La cuantificación de los anticuerpos anti-E7 se llevó a cabo mediante ELISA utilizando PD1/3 16E7 2M como antígeno de recubrimiento. Se usaron soluciones de antígeno y anticuerpo a 100 µl por pocillo. El antígeno se diluyó hasta una concentración final de 0,5 µg/ml en PBS y se adsorbió 25 durante la noche a 4°C en los pocillos de placas de

microensayo de 96 pocillos (Marxisorb Immuno-plate, Nunc, Dinamarca). Los pocillos se incubaron luego durante una hora a 37°C con PBS que contenía un 1% de albúmina de suero bovino y Tween 20 al 0,1% (tampón de saturación). Se añadieron 5 diluciones a la mitad de suero (inicialmente con dilución 1/100 o 1/400) en el tampón de saturación a las placas recubiertas de E7 y se incubaron durante una hora y 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS y Tween 20 al 0,1% y se añadió anti-ratón Ig, IgG1, IgG2a, 10 IgG2b conjugado con biotina (Amersham, Reino Unido) diluido a 1/1500 en tampón de saturación a cada pocillo y se incubó durante una hora y 30 minutos a 37°C. Después de la etapa de lavado se añadió complejo de peroxidasa estreptavidina-biotinilada (Amersham, Reino Unido) diluido a 1/5000 en 15 tampón de saturación durante 30 minutos más a 37°C. Las placas se lavaron como se explicó anteriormente y se incubaron durante 20 minutos con una solución de tetrametilbencidina (TMB) (Biorad, Estados Unidos) diluido dos veces en tampón de citrato (0,1 M a pH 5,8). La reacción 20 se inactivó con H₂SO₄ 0,5 N y se analizó a 450/630 nm. Se calcularon los títulos ELISA a partir de un estándar de SoftmaxPro (utilizando una ecuación de cuatro parámetros) y expresado en EU/ml.

25 Serología anti-VLP16 y anti-VLP18

La cuantificación de los anticuerpos anti-VLP16 y anti-VLP18 se llevó a cabo mediante ELISA utilizando VLP16 503/1 (20/12/99) y VLP18 504/2 (25/10/99F) como antígenos de recubrimiento. Se usaron soluciones de antígeno y anticuerpo de 50 μ l por pocillo. El antígeno se diluyó hasta una concentración final de 0,5 μ g/ml en PBS y se adsorbió durante la noche a 4°C en los pocillos de placas de microensayo de 96 pocillos (Marxisorb Immuno-plate, Nunc, Dinamarca). Los pocillos se incubaron luego durante una hora a 37°C con PBS que contenía un 1% de albúmina de suero bovino. Se añadieron diluciones a la mitad de suero (inicialmente con dilución 1/400) en el tampón de saturación a las placas recubiertas de VLP y se incubaron durante una hora y 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS y Tween 20 al 0,1% y se añadió anti-ratón Ig conjugado con biotina (Amersham, Reino Unido) diluido a 1/1500 en tampón de saturación a cada pocillo y se incubó durante una hora y 30 minutos a 37°C. Después de la etapa de lavado se añadió complejo de peroxidasa estreptavidina-biotinilada (Amersham, Reino Unido) diluido a 1/1000 en tampón de saturación durante 30 minutos más a 37°C. Las placas se lavaron como se explicó anteriormente y se incubaron durante 20 minutos con una solución de o-fenilendiamina (Sigma) al 0,04%, H₂O₂ al 0,03% en Tween 20 al 01% y tampón de citrato 0,5M a pH 4,5. La reacción se inactivó con H₂SO₄ 2 N y se analizó a 450/630 nm.

Se calcularon los títulos ELISA a partir de un estándar de SoftmaxPro (utilizando una ecuación de cuatro parámetros) y expresado en EU/ml.

5 Proliferación de células T

Dos semanas después de la segunda inmunización se sacrificaron los ratones, se les extrajeron los bazo asépticamente y se reunieron (una agrupación de cinco órganos por grupo). Las suspensiones de células se prepararon en un medio de RPMI 1640 (GIBCO) que contenía L-glutamina 2 mM, antibióticos, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M y un 1% de suero de ratón normal singénico. Las células del bazo se cultivaron hasta una concentración final de 2×10^6 células/ml en 200 μ en placas de 96 pocillos de fondo redondo con diferentes concentraciones (10-0,03 μ g/ml) de cada uno de los Ag (antígenos VLPs, E7 o HBs). Cada uno de los ensayos se llevó a cabo por cuadruplicado. Después de 96 horas de cultivo a 37°C en un 5% de CO₂, se dio un pulso a las células durante 18 horas con ³H-timidina (Amersham, UK, 5Ci/mmol) a 0,5 microCi/pocillo y luego se recolectaron en placas Unifilter (Packard) con un recolector de células. Se midió la radioactividad incorporada en un contador de centelleo (Topcount, Packard). Los resultados se expresaron en cpm (cpm promedio en pocillo cuadruplicado) o como índices de estimulación (cada cpm promedio en cultivos de células con

antígeno / cpm promedio en cultivos de células sin antígeno).

Producción de citocinas

Dos semanas después de la segunda inmunización, se
5 sacrificaron los ratones, se les extrajeron los bazo
asépticamente y se reunieron. Las suspensiones de células se
prepararon en un medio de RPMI 1640 (GIBCO) que contenía L-
glutamina 2 mM, antibióticos, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M y un
5% de suero bovino fetal. Las células se cultivaron hasta una
10 concentración final de 5×10^6 células/ml, en 1 ml por placa de
24 pocillos de fondo plano con diferentes concentraciones
(10^{-1} μ g/ml) de cada uno de los Ag (antígenos VLPs, E7 o
HBs). Los sobrenadantes se recogieron 96 horas después y se
congelaron hasta el ensayo en presencia de IFN $_{\gamma}$ y IL5
15 mediante Elisa.

IFN $_{\gamma}$ (Genzyme)

La cuantificación de IFN $_{\gamma}$ se llevó a cabo por Elisa
utilizando los reactivos de Genzyme. Las soluciones de
20 muestra y de anticuerpos fueron de 50 μ l por pocillo. Se
recubrieron durante la noche las placas de microensayo de 96
pocillos (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dinamarca) a 4°C con
50 μ l de IFN $_{\gamma}$ de hamster anti-ratón diluido a 1,5 μ g en
tampón de carbonato a un pH de 9,5. Las placas se incubaron
25 durante una hora a 37°C con 100 μ l de PBS que contenía un 1%

de albúmina de suero bovino y Tween 20 al 0,1% (tampón de saturación). Se añadieron diluciones a la mitad de sobrenadante de la estimulación *in vitro* (comenzando a 1/2) en tampón de saturación a las placas recubiertas de antígeno IFN γ , y se incubaron durante una hora y 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS Tween al 0,1% (tampón de lavado) y se añadió IFN γ de cabra anti-ratón conjugado con biotina diluido en tampón de saturación a una concentración final de 0,5 μ g a cada pocillo y se incubó durante una hora a 37°C. Después de la etapa de lavado, se añadió AMDEX conjugado (Amersham) diluido a 1/10000 en tampón de saturación durante 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron como se indicó y se incubaron con 50 μ l de TMB (Biorad) durante 10 minutos. La reacción se inactivó con H $_2$ SO $_4$ 0,4 N y se analizó a 450/630 nm. Las concentraciones se calcularon utilizando la curva estándar (IFN γ de ratón estándar) de SoftmaxPro (ecuación de cuatro parámetros) y se expresó en pg/ml.

20 IL5 (Pharmingen)

La cuantificación de IL5 se llevó a cabo por Elisa utilizando los reactivos de Pharmingen. Las soluciones de muestra y de anticuerpos fueron de 50 μ l por pocillo. Se recubrieron durante la noche las placas de microensayo de 96 pocillos (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dinamarca) a 4°C con

50 μ l de IL5 de rata anti-ratón diluido a 1 μ g en tampón de carbonato a un pH de 9,5. Las placas se incubaron durante una hora a 37°C con 100 μ g de PBS que contenía un 1% de albúmina de suero bovino y Tween 20 al 0,1% (tampón de saturación).

5 Se añadieron diluciones a la mitad de sobrenadante de la estimulación *in vitro* (comenzando a 1/2) en tampón de saturación a las placas recubiertas de antígeno IL-5 y se incubaron durante una hora y 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS y Tween al 0,1% (tampón de 10 lavado) y se añadió IL5 de rata anti-ratón conjugado con biotina diluido en tampón de saturación a una concentración final de 1 μ g a cada pocillo y se incubó durante una hora a 37°C. Después de la etapa de lavado, se añadió AMDEX conjugado (Amersham) diluido a 1/10000 en tampón de 15 saturación durante 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron como se indicó y se incubaron con 50 μ l de TMB (Biorad) durante 15 minutos. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 0,4 N y se analizó a 450/630 nm. Las concentraciones se calcularon utilizando la curva estándar (IL5 recombinante de ratón) de 20 SoftmaxPro (ecuación de cuatro parámetros) y se expresó en pg/ml.

GRUPOS

Se inmunizaron grupos de ratones 10 Balb/C intramuscularmente 25 con las siguientes formulaciones:

48

Tabla 1: Grupos y formulaciones

5

10

GRUPO	FORMULACIÓN
A	VLP16 2µg / VLP18 2µg / 3D-MPL 5µg / Al(OH) ₃ 50 µg
B	16E7 2 µg / 3D-MPL 5 µg / Al(OH) ₃ 50 µg
C	HBS 2 µg / 3D-MPL 5µg / AlPO ₄ 50 µg
D	HBS 2 µg / 3D-MPL 5µg / AlPO ₄ 20 µg / Al(OH) ₃ 30 µg
E	HBS 2 µg / 3D-MPL 5µg / AlPO ₄ 10 µg / Al(OH) ₃ 40 µg
F	16E7 2 µg / HBS 2 µg / 3D-MPL 5 µg / Al(OH) ₃ 40 µg / AlPO ₄ 10 µg
G	VLP16 2 µg / VLP18 2 µg / HBS 2 µg / 3D-MPL 5µg / Al(OH) ₃ 40 µg / AlPO ₄ 10 µg
H	VLP16 2 µg / VLP18 2 µg / HBS 2 µg / 3D-MPL 5µg / Al(OH) ₃ 35 µg / AlPO ₄ 15 µg

No está prot D1/3 - HPV 16E7 His .

Se describieron anteriormente los detalles de la formulación en Materiales y Procedimientos. (Tabla 6).

RESULTADOS

1. Serología

a) Respuesta anti-HBs:

5

Las respuestas humorales (Ig e isotipos) se miden mediante Elisa utilizando HBsAg (Hep286) como antígeno de recubrimiento. Se analizó el suero post II del día 14.

10 La Figura 1 muestra las respuestas del anticuerpo anti-HBs medidas en sueros individuales post II del día 14.

No se observó diferencia alguna en la respuesta del anticuerpo anti-HBs entre los protocolos aplicados para 15 adsorber el 3D-MPL: sobre AL(OH)₃ solo o sobre AlPO₄ solo (grupos C, D, E) con diferentes relaciones de AL(OH)₃ y AlPO₄ en la vacuna (GTM de 27905 EU/ml frente a 30832 o 26670 EU/ml).

20 Se observó una respuesta ligeramente inferior de los anticuerpos anti-HBs en combinación con los grupos G y H que contenían los antígenos de VLPs y HBs comparado con el HBs solo (grupo CC) (GTM respectivamente de 10635 o 15589 EU/ml frente a 27905 EU/ml). El GTM del antígeno anti-HBs obtenido 25 en la combinación E7/HBs alcanzó 19235 EU/ml.

Antes del análisis estadístico, se efectuó un ensayo de T-Grubbs en cada población para la exclusión de datos. Se eliminó un ratón del grupo C durante el análisis.

5 Se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía sobre títulos anti-HBs después de la transformación logarítmica de los datos post II. Se observaron diferencias significativas entre las formulaciones (valor $p = 0,0108$) y el ensayo Student Newman Keuls se aplicó luego para múltiples
10 comparaciones. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones del grupo H (VLP/HBs) o el grupo F (HBs/E7) frente a la del grupo C (HBs AS04C. Se mostró una diferencia significativa estadísticamente entre el grupo G (VLP/HBs) y el grupo C (HBs AS04C) (valor $p =$
15 $0,0291$) no obstante el 95% de los intervalos de confianza de los dos grupos se solapa y la diferencia que alcanza una relación de 2,5 podría no ser biológicamente relevante.

El reparto isotópico analizado en suero reunido es como
20 se muestra a continuación, no hay diferencias importantes entre los dos grupos.

	Reparto Isotípico (%) Anti-H60		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
Grupo C	59	31	10
Grupo D	69	19	12
Grupo E	66	19	15
Grupo F	61	22	17
Grupo G	61	30	9
Grupo H	46	29	25

10 b) Respuesta anti- E7:

Se midieron las respuestas humorales (Ig e isotipos) mediante Elisa utilizando un PD1/3 16E7 2M como antígeno de recubrimiento.

15

La Figura 2 muestra la respuesta de anticuerpos anti-E7 medida en sueros individuales del día 14 post II:

Se observó un ligero decrecimiento en la respuesta anti-
20 E7 con dos decrecimientos del GTM para las combinaciones HBs/E7 comparadas con el E7 solo (9626 frente a 22447 EU/ml). Esto se estableció como estadísticamente insignificante

utilizando el ensayo de Student Newman Keuls.

No se observaron diferencias en el perfil isotópico inducido por las dos formulaciones: principalmente la
5 respuesta a IgG1 (37-38% de IgG1) como se señaló en la tabla anterior.

El reparto isotópico analizado en suero reunido es el siguiente:

10

	Reparto isotópico (%) <i>Anti Et</i>		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
Grupo B	98	0	1
Grupo F	97	1	2

15

c) Respuesta anti-VLP16:

Las respuestas humorales (Ig) se midieron por títulos Elisa VLP16 503-1 (20/12/99) como antígeno de recubrimiento. Se analizaron los sueros del día 14 post II.

20

La figura 3 muestra la respuesta de un anticuerpo Ig anti-VLP16 medida en sueros individuales del día 14 post II.

Se obtuvieron títulos similares anti-VLP16 después de

la inmunización con la combinación de HBs y VLPs (grupo G y H) así como con la formulación VLPs monovalente (grupo A) (GTM de 19570 o 23448 EU/ml frente a 30311 EU/ml).

- 5 Se observaron títulos equivalentes entre las dos combinaciones preparadas utilizando las dos vías para adsorber el 3D-MPL: Al(OH)₃ solo (grupo G) comparado con la adsorción mixta sobre Al(OH)₃ y AlPO₄ (grupo H) (GTM de 19570 EU/ml frente a 23448 EU/ml).

10

Estas diferencias no se muestran estadísticamente significativas utilizando un ensayo de varianza de análisis de una vía.

15 d) Respuesta anti-VLP18

Las respuestas humorales (Ig) se midieron por Elisa utilizando VLP18 504-2 (25/10/99) como antígeno de recubrimiento. Se analizaron sueros del día 14 post II.

- 20 La figura 4 muestra la respuesta del anticuerpo IG anti-VLP18 medida en sueros individuales del día 14 post II.

Se obtuvieron títulos similares anti-VLP18 después de la inmunización con la combinación de HBs y VLPs (grupo G y
25 H) o con la formulaciones de VLPs monovalente (grupo A) (GMT

de 37285 o 51202 EU/ml frente a 56504 EU/ml).

Se observaron títulos equivalentes (grupos G y H) entre las combinaciones preparadas utilizando las dos vías para adsorber el 3D-MPL: Al(OH)₃, solo (grupo G) comparado con la adsorción mixta sobre Al(OH)₃ y AlPO₄ (grupo H).

Estas diferencias no se muestran estadísticamente significativas utilizando un ensayo de varianza de análisis de una vía.

2. Respuesta inmune mediada por células

Las respuestas inmunes mediadas por células (linfoproliferación, IFN_γ / producción de IL5) se evaluaron en el día 14 post II después de la reestimulación in vitro de las células del bazo con antígenos HBs, E7 o VLPS. Para cada grupo de ratones, se formaron agrupaciones de 5 órganos.

El procedimiento experimental se describe por completo anteriormente en Materiales y Procedimientos.

20

3. Producción de citocinas.

a) Reestimulación in vitro con HBs

La figura 5 muestra la producción de citocinas registrada en células del bazo después de 96 horas de reestimulación in vitro con HBs.

25

Se observó una baja producción de IFN γ y IL5 para todos los grupos pero como se muestra en la tabla 2 se observó una alta producción de IFN γ comparada con la producción de IL-5 con una relación IFN γ /IL-5 que indica que se induce una 5 respuesta TH1 comparable con las vacunas monovalentes y combinadas. El grupo C no se debería tener en cuenta ya que los datos pueden indicar la ausencia de antígeno para la reestimulación.

10 Tabla 2: relación IFN γ / IL-5 después de la reestimulación con HBs

15

Relación IFN/IL-5	Grupo C	Grupo D	Grupo E	Grupo F	Grupo G	Grupo H
HBs 10 μ g	0,3	4,0	9,4	7,9	7,9	6,6
HBs 1 μ g	0,4	3,7	1,5	4,0	4,0	5,0

b) Reestimulación in vitro con HBs

La figura 6 muestra la producción de citocinas 20 registrada en células del bazo después de 96 horas de reestimulación in vitro con antígeno E7.

Se observó un efecto de intervalo de dosis cuando se comparó la dosis de 10 μ g y 1 μ g de Ag durante la

reestimulación.

Se observó una reactividad cruzada para los grupos inmunizados con VLPs HPV16/18 L1 utilizando 10 µg de Ag para 5 la reestimulación.

El IFN_γ se produce en mucha mayor concentración comparado con IL-5 (tabla 3) indicando un claro perfil de respuesta inmune TH-1 en todos los grupos evaluados 10 (monovalentes frente a combinación).

Tabla 3; relación IFN_γ / IL-5 después de la reestimulación con E7

15

Relación IFN / IL-5	Grupo B	Grupo F
E7 10 µg	17,7	12,9
E7 1 µg	8,9	1,2

20 c) Reestimulación in vitro con VLP16 y 18

Las figuras 7 y 8 muestran la linfoproliferación después de la reestimulación in vitro con VLP16 o VLP18 en el día 14 post II.

Se observaron perfiles comparables para todas las formulaciones que contenían VLPs (índices estimulados integrados de 12-29) con valores de cpm en torno a 30000 para una dosis de reestimulación de 10 µg de Ag, indicando la
5 ausencia de interferencia entre la diferentes formulaciones en esta lectura.

La figura 9 muestra la producción de citocina registrada en células del bazo después de 96 horas de reestimulación in
10 vitro con VLP16.

La figura 10 muestra la producción de citocina registrada en células del bazo después de 96 horas de reestimulación in vitro con VLP18.

15

No se ha observado efecto de intervalo de dosis utilizando una dosis de 10 µg y 1 µg de Ag para la reestimulación con antígenos VLP en la producción de citocinas. Se observó un claro perfil de TH1 con todas las
20 formulaciones.

Tabla 5; relación IFN_γ / IL-5 después de la reestimulación con VLP16 y VLP18

25

5

Relación IFN / IL5	Grupo A	Grupo B	Grupo C
VPL16 10 μg/ml	12,0	19,9	16,5
VPL16 1 μg/ml	22,1	37,9	23,2

10

Relación IFN / IL5	Grupo A	Grupo B	Grupo C
VPL18 10 μg/ml	20,5	17,9	13,4
VPL18 1 μg/ml	21,8	23,7	21,0

15

CONCLUSIONES

20

Se evaluó el efecto de la combinación de VLPs/HBs o E7/HBs Ag formuladas en NS04 sobre la inmunogenicidad en ratones Balb/C:

En referencia a los análisis serológicos, no se observó interferencia alguna de la combinación de Ag respecto a la

56

serología anti-HBs, anti-E7 y anti-VLPs.

La combinación de antígenos VLPs y HBs o E7 y HBs no interfirió con el perfil isotípico de la respuesta a los
5 anticuerpos registrada en la vacuna monovalente.

El procedimiento de adsorción de 3D-MPL, $\text{Al}(\text{OH})_3$, AlPO_4 o mezclas de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y AlPO_4 no interfirió con los resultados serológicos.

10

En los ensayos de linfoproliferación, los resultados estaban disponibles tras la reestimulación con los VLPs. En estos grupos, no se observaron efectos negativos de la combinación de Ag en la respuesta proliferativa.

15

Para la evaluación de las citocinas, la producción baja de citocina (IL-5 y IFN_γ) se obtuvo después de la reestimulación con HBs Ag pero las respuestas fueron comparables en las vacunas combinada y monovalente. Después
20 de la reestimulación con E7 o con VLPs, los niveles de citocinas comparables se produjeron respectivamente en la combinación E7/HBs o en VLP/HBs tal como se comparó con los grupos monovalentes. El perfil TH1 observado con cada vacuna monovalente se mantuvo en los grupos de vacuna de
25 combinación.

Habiendo descrito la invención como antecede, se declaran como propiedad las siguientes

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna que comprende:
 - 5 a) un antígeno de la hepatitis B viral (HBV); y
 - b) un antígeno del virus del papiloma humano (HPV)en combinación con un coadyuvante que es un estimulador preferencial de la respuesta de células TH1.
- 10 2. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además un vehículo.
3. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la que el
15 estimulador preferencial de la respuesta de células TH1 se selecciona del grupo de coadyuvantes que comprende: 3D-MPL, en el que el tamaño de las partículas de 3D-MPL es preferiblemente de aproximadamente 100 nm o inferior, QS21, una mezcla de QS21 y colesterol, y un oligonucleótido CpG.
20
4. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 3 en la que el estimulador preferencial de la respuesta de células TH1 es el 3D-MPL.
- 25 5. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera

de las reivindicaciones 1 a 4 en la que el antígeno de la hepatitis B es un antígeno de superficie de la hepatitis B.

6. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera
5 de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende al menos un antígeno de HPV seleccionado del grupo constituido por L1, L2, E6 y E7, opcionalmente en forma de una proteína de fusión o una proteína truncada.

10 7. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la que el antígeno de EBV está presente de forma adicional.

8. Una composición de vacuna como se define en la
15 reivindicación 7 en la que un antígeno de EBV es gp 350.

9. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la que está presente adicionalmente un antígeno de la hepatitis A.

20

10. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 9 en la que el antígeno de HAV proviene de la cepa HM-175.

25 11. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera

de las reivindicaciones 1 a 6 en la que está adicionalmente presente el antígeno del virus simple de la herpes (HSV)

12. Una composición de vacuna de acuerdo con la
5 reivindicación 11 en la que el antígeno HSV es HSV-2 gD o una forma truncada del mismo.

13. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en la que el vehículo se
10 selecciona de un grupo constituido por hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y tocoferol y una emulsión de aceite en agua.

14. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 13 que comprende adicionalmente un antígeno de VZV.

15. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 14 en la que el antígeno de VZV es gpI.

20

16. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende adicionalmente un antígeno de HCMV.

25 17. Una composición de vacuna de acuerdo con la

reivindicación 16 en la que el antígeno de HCMV es gB685** o pp65.

18. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera
5 de las reivindicaciones 1 a 17 que comprende de forma adicional un antígeno de *Toxoplasma gondii*.

19. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 18 en la que el antígeno de *Toxoplasma gondii*
10 es SAG1 o TG34.

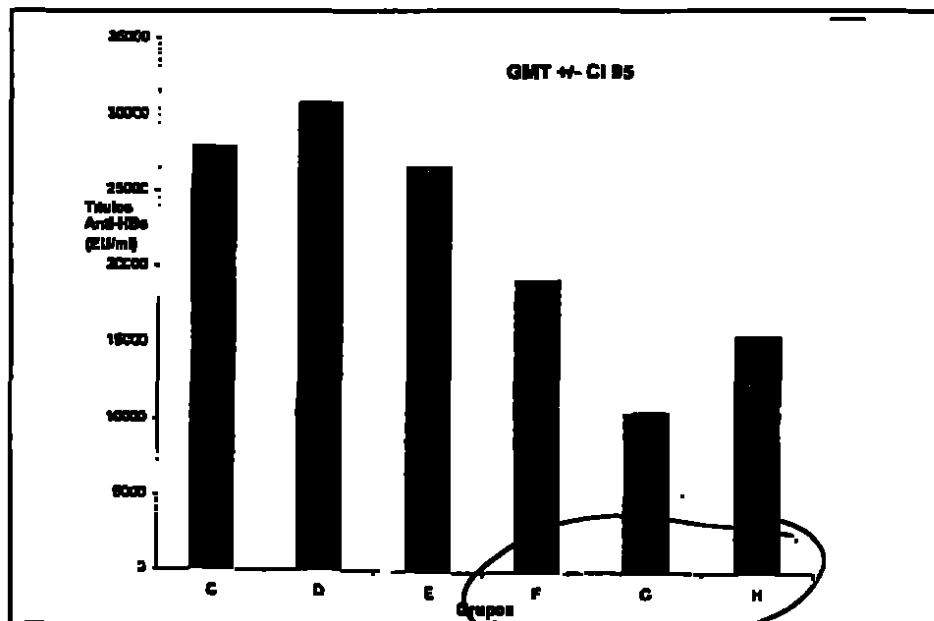
20. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende antígeno HBsAg S y L1, L2, E6, E7, proteína D-E6, proteína D-E7 o L2E7 de
15 HPV y además opcionalmente una o más de las cepas inactivadas de HSV-2 gDt; EBV gp 350; VZVgpI; HAV HM-175; antígenos gB685** o pp65 de HCMV y SAG1 o TG34 de *Toxoplasma gondii*.

Resumen

Se proporcionan nuevas composiciones de vacunas de combinación que comprenden un antígeno viral de la hepatitis B y un antígeno de HPV y además, opcionalmente uno o más de los siguientes componentes: un antígeno EBV, un antígeno de la hepatitis A o un virus atenuado inactivado, un antígeno viral del herpes simple, un antígeno de VZV, un antígeno de HCMV, un antígeno de Toxoplasma gondii. Las composiciones de vacuna se formulan con un coadyuvante que es un estimulador potencial de la respuesta de las células TH1 tal como el 3D-MPL y el QS21.

FIGURA 1: MEDI9904/PIMS19990739 respuesta anti-HBs en el día 14 posterior a II.

Resultados en sueros individuales (EU/ml)



↳ La respuesta inmunogénica
ya las complicaciones
es menor q' el ag
solo.

FIGURA 2: MEDI9904/PIMS19990739 respuesta anti-PD1/3 16E7 en el día 14 posterior a II

Resultados en sueros individuales (EU/ml)

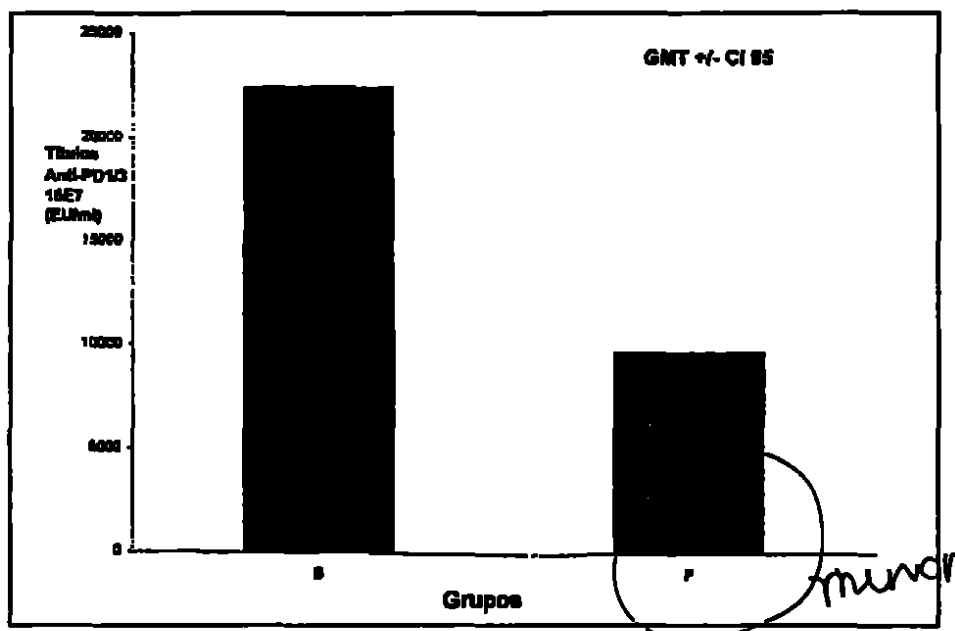
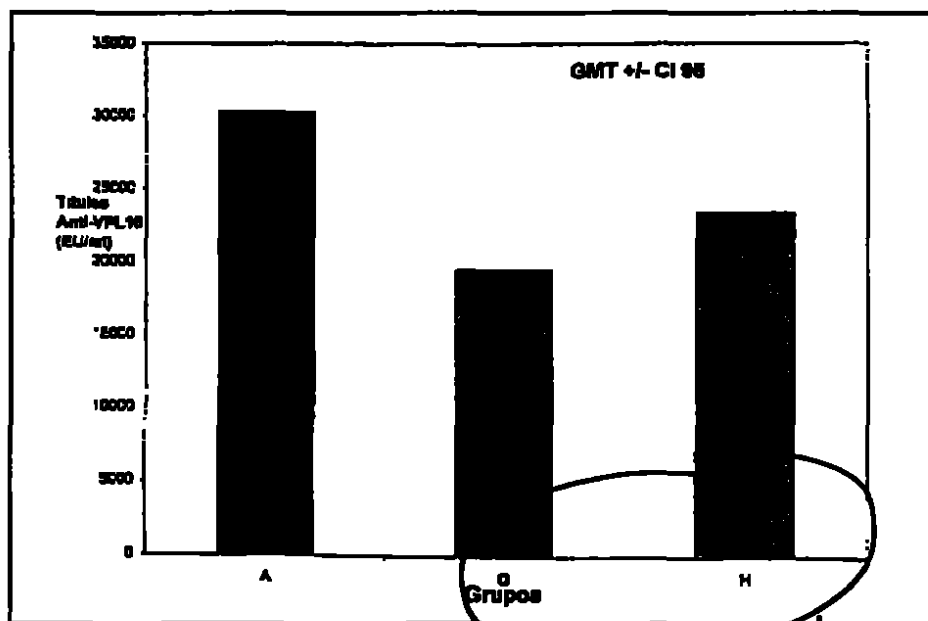


FIGURA 3: MEDI9904/PIMS19990739 respuesta anti-VLP16 en el día 14 posterior a II

Resultados en sueros individuales (EU/ml)



*Alta inmunogenicidad
¿q' el antígeno
solo*

68

FIGURA 4: MEDI9904/PIMS19990739 respuesta anti-VLP18 en el día 14 posterior a II

Resultados en sueros individuales (EU/ml)

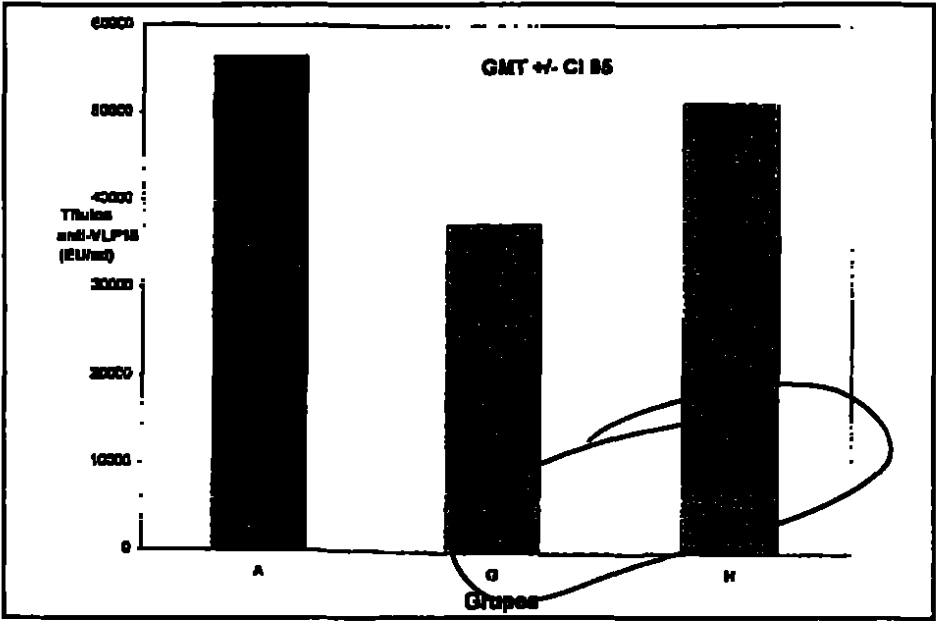
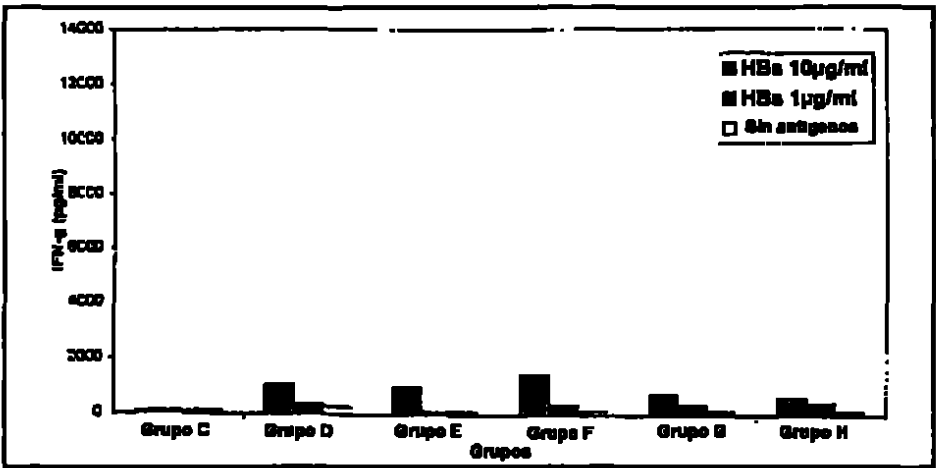


FIGURA 5: MEDI9904/PIMS19990739 resultados de citocinas en el día 14 posterior a II

Producción de IFN γ después de la estimulación in vitro con HBs



Producción de IL-5 después de la estimulación in vitro con HBs

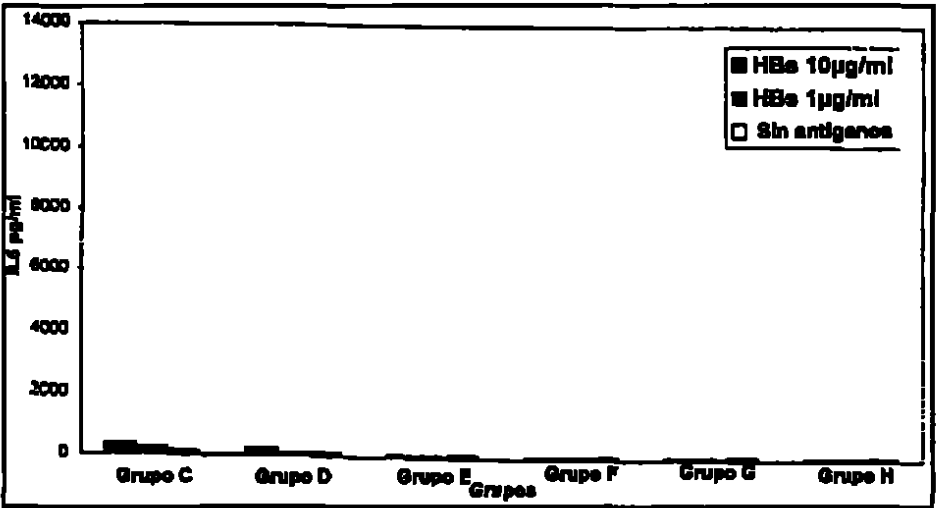
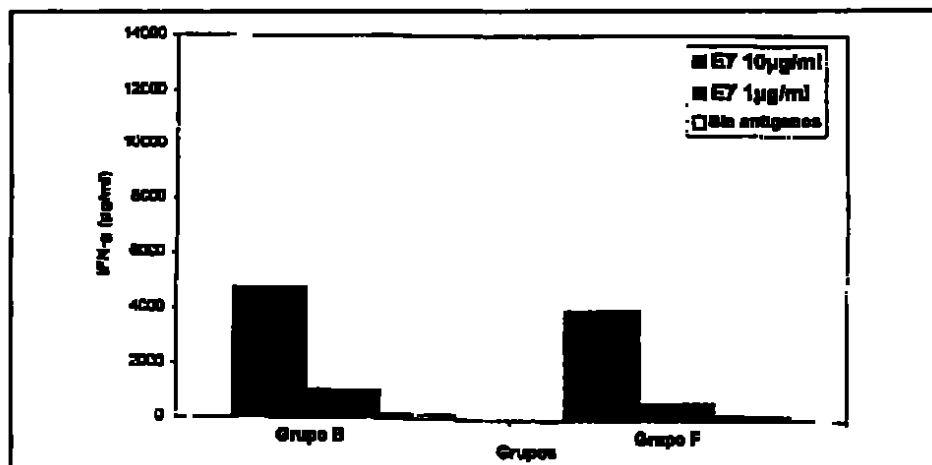


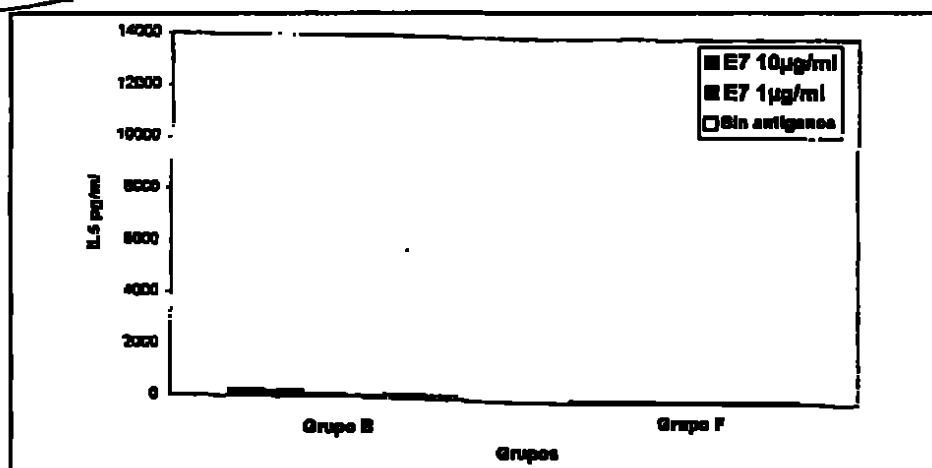
FIGURA 6: MEDI9904/PIMS19990739 resultados de citocinas en el día 14 posterior a II

Producción de IFN γ después de la estimulación in vitro con PD 1/3 E7



Producción de IFN γ después de la estimulación in vitro con PD

1/3 16E7



11

FIGURA 7: MEDI9904/PIMS19990739 resultados de linfoproliferación

Estimulación in vitro con VLP16 en el día 14 después de II

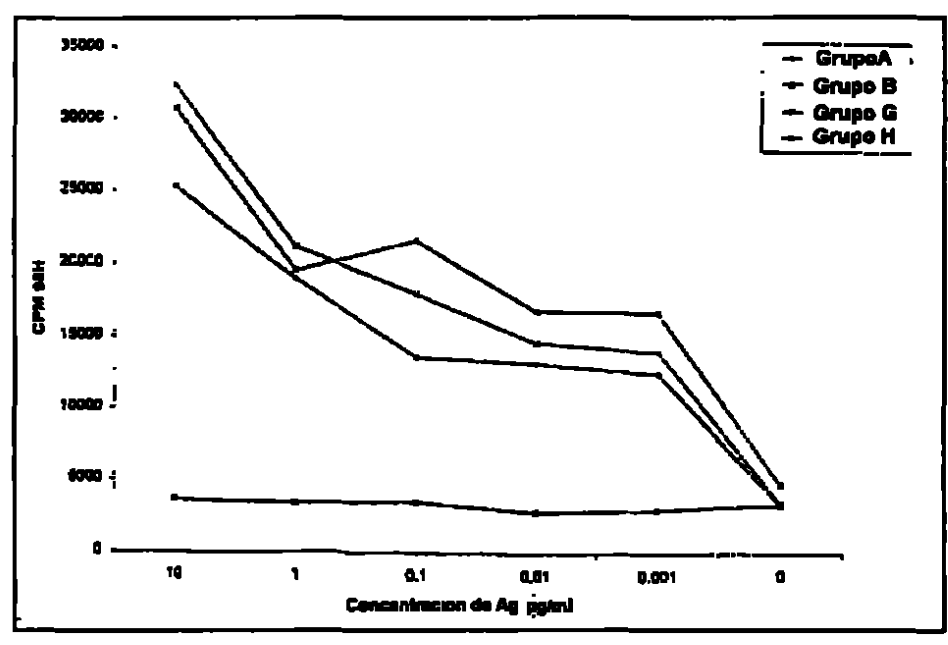


FIGURA 8: MEDI9904/PIMS19990739 resultados de linfoproliferación

Estimulación in vitro con VLP18 en el día 14 después de II

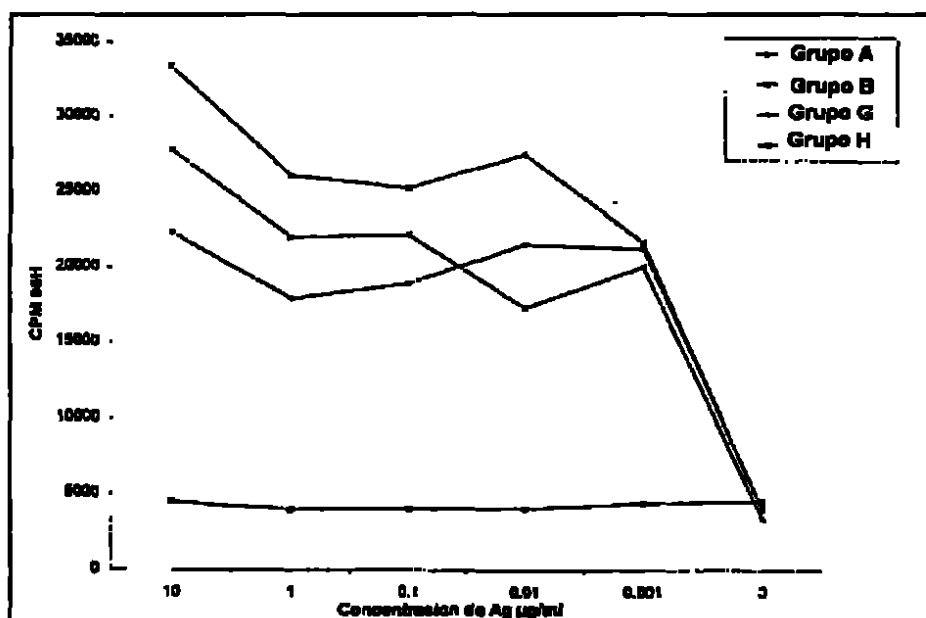
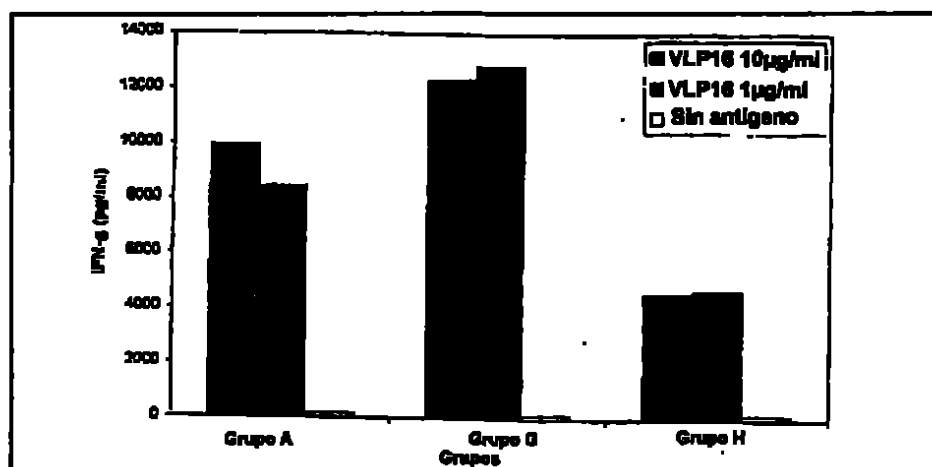
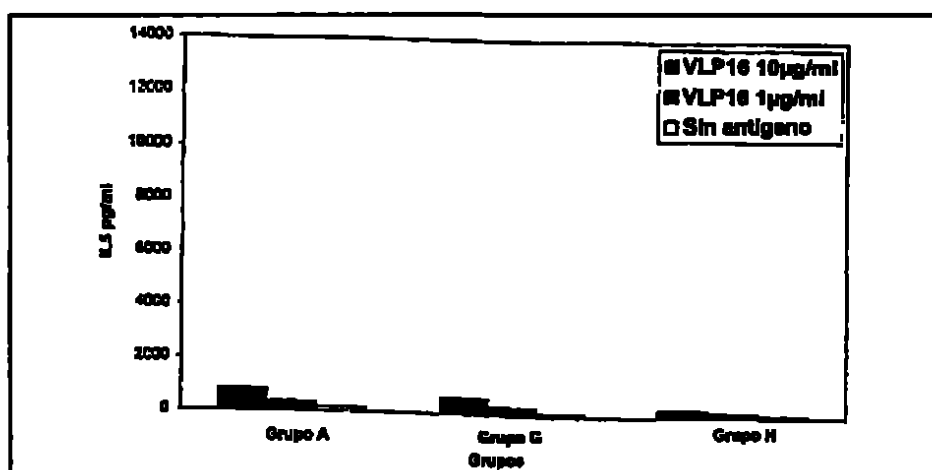


FIGURA 9: MEDI9904/PIMS19990739 resultados de citocinas en el día 14 posterior a II

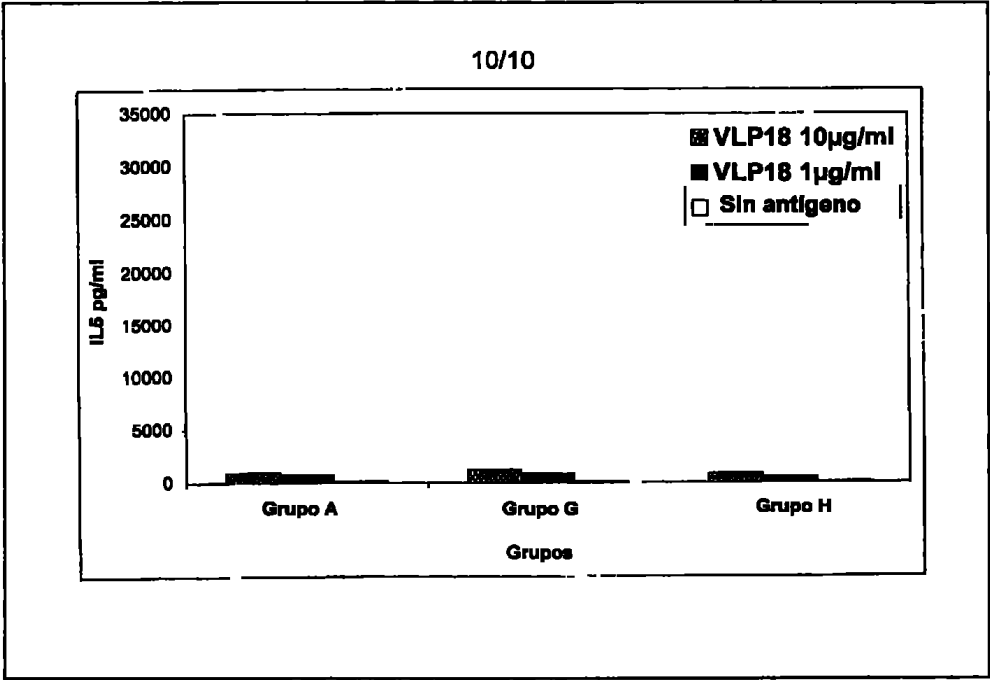
Producción de IFN γ después de la estimulación in vitro con VLP16



Producción de IL-5 después de la estimulación in vitro con VLP16



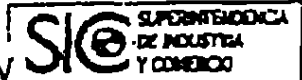
74



Handwritten signature and date 10/10

Sehman wofolts 75 y 76
de 202016

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION**



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN:

(71) SOLICITANTE:

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.

(30) PRIORIDAD:

(31) No. DE SOLICITUD: GB 9921147.6

(72) INVENTORES:

Martine Anne Cecile WETTENDORF

(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN: Septiembre 7, 1999

(33) PAÍS: INGLESA

(74) APODERADO:

GERMAN CASTILLO GRAU

(54) TÍTULO: NUEVA COMPOSICIÓN

(57) RESUMEN:

1. Una composición de vacuna que comprende:

a) un antígeno de la hepatitis B viral (HBV); y

b) un antígeno del virus del papiloma humano (HPV)

en combinación con un coadyuvante que es un estimulador preferencial de la respuesta de células TH1.

3. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la que el estimulador preferencial de la respuesta de células TH1 se selecciona del grupo de coadyuvantes que comprende: 3D-MPL, en el que el tamaño de las partículas de 3D-MPL es preferiblemente de aproximadamente 100 nm o inferior, QS21, una mezcla de QS21 y colesterol, y un oligonucleótido CpG.

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD []

- Nombre e identificación del Solicitante 1 []
- Nombre e identificación del Inventor 1 []
- Título o nombre de la Invención 1 []
- Descripción 4 []
- Reivindicaciones 60 []
- Resumen 2 + 64 []
- Comprobante de Pago 3 []
- Poder, cuando proceda []
- Copia de la primera solicitud de patente, si reivindica prioridad, señalándola expresamente []
- Firma del solicitante o apoderado 2 []

COMPLETA ☒

INCOMPLETA []

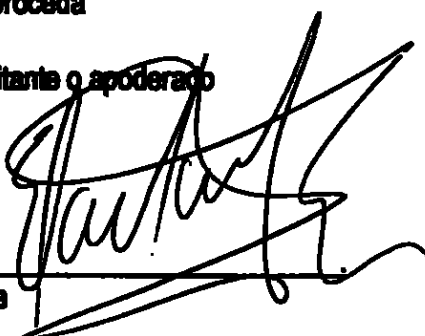
DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario []
- Nombre e identificación del inventor o diseñador []
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse []
- Representación gráfica []
- Comprobante de pago []
- Poder, cuando proceda []
- Firma del solicitante o apoderado []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable



Fecha Radicación : 05366606 00330623 Folios: 77
Fecha (HH): 2009-09-05 13:31:47
Trámite : 032 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE MARCAS Y DISEÑOS

Carrera 13 No. 27-00 Piso 6 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 26 e-mail: info@pic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 00-66606.

Fecha: 6 de septiembre del 2000.

Se certifica que:

Desde fecha 12 de julio de 1996,
del folio 86.459 al folio 86.464 del
libro de Protocolo N° 298, obra el poder
N° 16.769 conferido por SMITHKLINE
BEECHAMAN BIOLOGICALS S.A.

domiciliado(a) en Rixensart - Bélgica

al doctor GERMAN CASTILLO GRAU y/o ADRIANA
CASTILLO GIBSONE y/o LUIS FELIPE CASTILLO
GIBSONE.

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los
misos.

Facultad para desistir SI.

Revisado _____.

78

**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA**

EXPEDIENTE: 00-66606

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación (art. 13-f de la Decisión 344 y el Decreto 298 del 17 de febrero de 1999)

SI ☒ NO ☐ EXTEMPORANEAMENTE ☐ Reivindicó prioridad, de acuerdo con lo previsto en el art. 12 de la Decisión 344.

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Indicó fuente normativa de reciprocidad (Decisión 344, art. 12; Decreto 117/94, art. 4 literal f).

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Contiene la copia de la solicitud de la cual reclama prioridad (art. 14-b Decisión 344).

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Contiene la traducción oficial de las reivindicaciones de la primera solicitud de patente, avalada por el Ministerio de Relaciones Exteriores (arts. 14-c Decisión 344, 4-e) Decreto 117/94, Circular externa número 004 de 1997).

SI ☐ NO ☒ CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS

OBSERVACIONES Y OTROS:

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI ☐ NO ☒ Se ajusta a los aspectos FORMALES indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☐ NO ☒ Se recomienda PUBLICAR el extracto correspondiente.

Bogotá, D.C., 6 de septiembre del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.
202022

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO.
PRIMER EXAMEN DE FORMA.

Radicación No. 00-66606

Concepto Técnico No. 1722

Clasificación Internacional de Patentes: A61K 39/295, A61K 39/245.

Practicado el examen, de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344, se determinó que la presente solicitud de **Patente de Invención**:

- | | |
|--|--|
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del inventor (Art. 8, Art 13-a). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del solicitante (Art. 13-a) |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art. 13-e) |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art. 13-b) |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art. 13-c) |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene los dibujos correctos (Art. 14-c junto con el literal d) del Art. 4 del (Dto. 117 del 94). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art. 14-c junto con el Dto. 3464 del 26 de diciembre de 1980) |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual solicita protección mediante la patente (Art. 13-d). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 de Dto 117 del 94. |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 del 94. |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la tarjeta de archivo temático (forma P-104) en forma correcta (Artc 14-c junto con el literal b) del 1rt. 4 del Dto. 117 del 94). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la tarjeta de archivo de propietarios (forma P-105) en forma correcta (Art. 14-c junto con el literal b) del Art. 4 del Dto. 117 del 94). |
| SI ☐ NO ☒ | CUMPLE CON LOS REQUISITOS TÉCNICOS DE FORMA. |

OBSERVACIONES DEL PRIMER EXAMEN TÉCNICO DE FORMA:

El título es muy general, no permite precisar cual es el objeto de la solicitud. Sírvase modificarlo de modo que corresponda con el objeto reclamado en las reivindicaciones y mencionado en el resumen y precise el objeto de la invención. Una opción para la modificación puede ser Vacunas polivalentes que comprenden antígenos de HSV y HPV. Sírvase presentar nuevas tarjetas y extracto de publicación con el título modificado.

EXAMINADOR TÉCNICO: 202016.

Bogotá, D.C., 30 de octubre de 2000

82
80

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-66606

AUTO 3186

LA JEFE DE DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE:

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor GERMAN CASTILLO GRAU como apoderado de la Sociedad solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido.

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complementé los antecedentes señalados en el examen de forma.

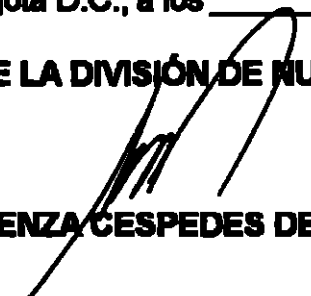
ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Bogotá D.C., a los

07 NOV. 2000

LA JEFE DE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES,


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

07 NOV 2000
Bogotá D.C.,

notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI___ NO___

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA