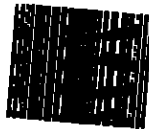


PETITORIO


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



03 009311 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 93009311 00000000
Fecha (ADM): 2003-02-06 16:16:09 Folios: 90
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

① **SOLICITUD DE:**
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

②
S LICITANTE
(71)

Nombre: **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**
Dirección: Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Bélgica.

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart, Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica.
Teléfono: 3264270 Fax: 6069701
E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③
REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **JOSE ANTONIO LLOREDA**
Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá- Colombia
Teléfono: 3264270 Fax: 6069701
E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 17.159.681 TP 10.784

④
INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: **DE HEYDER, Koen; SCHU, Peter; SERANTONI, Michelle y VAN OPSTEL, Omer**

Dirección: GlaxoSmithKline Biologicals, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica.

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.

PCT (86)

⑤ Solicitud Internacional No. PCT/EP01/09100 Fecha: 07/08/01
Publicación Internacional No. WO 02/12287 A1 Fecha: 14/02/02

⑥ Título (54) **"PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS HBV PARA EL USO EN VACUNAS"**

⑦ Clasificación Internacional (51) C07K 14/02 // A61 K 31/29

⑧ Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	GB GB	10/08/00 18/01/01	0019728.5 0101334.1

⑨ Comprobante de Pago No. 02-86.453 y 03-4.846 Fecha: 24-12-02 y 23-01-03

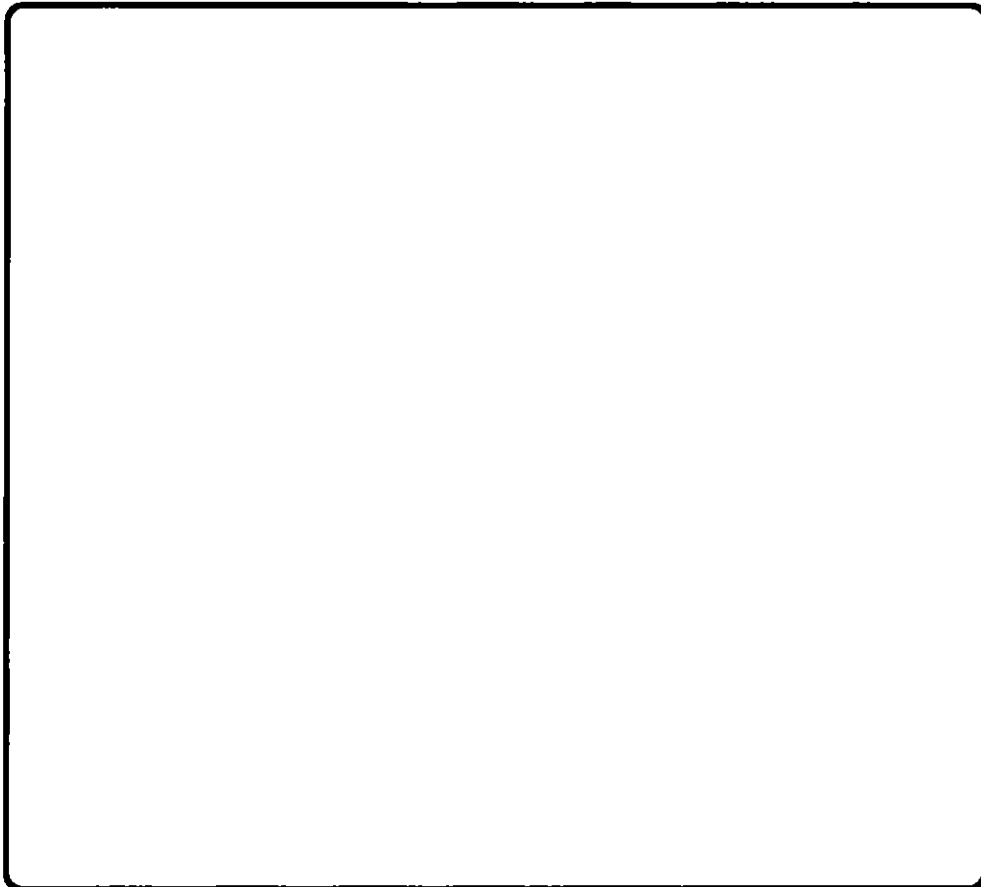
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros Reporte de Búsqueda Internacional y su traducción Publicación con su traducción, dibujos y Anexo Explicativo de Modificaciones a las Reivindicaciones.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JOSE ANTONIO LLOREDA

FIRMA:

C.C. 17.159.681 Bta. T.P. 10.784



Superintendencia de Industria y Comercio
Radicación : 03009311 00000000
Fecha (AEB): 2003-02-06 16:16:09
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE HACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

rcio
NCIA

NIT : 800170009-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 86,453
FECHA : DICIEMBRE 24 DE 2002

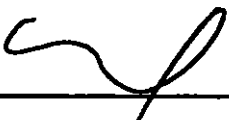
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PASO	BANCO	CUENTA	Nº. PASO	FECHA PASO	Vr. PASO
LLORCA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	31377731	24/12/2002	147,623,766.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01 01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
	TOTAL :	\$ 378,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 03 - 4,846
FECHA : ENERO 23 DE 2003

3
SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03009311 00000000
Fecha (AMD) : 2003-02-06 16:16:09
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NOCI 411 PRESENTAR
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Folios: 90-
cio
CIA

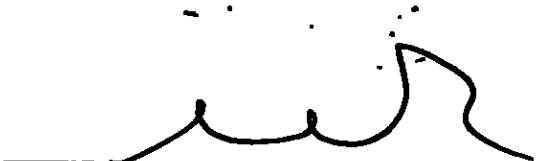
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	6382707	23/01/2003	668,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	22,000.00
	TOTAL :	22,000.00

SON: VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

fotos 4-6 de Extracto y
Tarjetas. 08-07-03

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 01/09100

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC7 C07K14/02 A61K39/29 C07K1/36

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 C07K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

WPI Dato, EPO-Internacional, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Dato

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 99 45957 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG; STEPHENNE JEAN (BE); WETTENDORFF MARTIN) 16 de Septiembre de 1999 (1999-09-16) página 2, línea 2 - línea 7 página 8, línea 2 - página 9, línea 9 página 16 - página 17; ejemplo 1	11-19, 21
X	EP 0 314 240 A (MERCK & CO INC) 3 de Mayo de 1989 (1989-05-03) página 2, línea 41 - línea 46 página 3, línea 6 - línea 13 página 5 - línea 37 - página 7; línea 15 página 7, línea 25 - página 8, línea 29	1-9 11-16, 21
A	GB 1 030 777 A (CIBA LTD) 25 de Mayo de 1966 (1966-05-25) reivindicaciones 1, 9, 10, 12, 13	
Y		

☐ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica al cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'Z' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

30 de Noviembre de 2001

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

17/12/ 2001

Nombre y dirección de correo de ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax No. (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Sitch, W

**Solicitud Internacional No.
PCT/EP 01/09100**

Forma PCT ISA 210 (anexo familia de patentes) (Julio 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/09100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/02 A61K39/29 C07K1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 45957 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG ;STEPHENNE JEAN (BE); WETTENDORFF MARTIN) 16 September 1999 (1999-09-16) page 2, line 2 - line 7 page 8, line 2 -page 9, line 9 page 16 -page 17; example 1	11-19,21
X	EP 0 314 240 A (MERCK & CO INC) 3 May 1989 (1989-05-03) page 2, line 41 - line 46 page 3, line 6 - line 13 page 5, line 37 -page 7, line 15 page 7, line 25 -page 8, line 29	1-9, 11-16,21
A	GB 1 030 777 A (CIBA LTD) 25 May 1966 (1966-05-25) claims 1,9,10,12,13	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 November 2001

Date of mailing of the international search report

17/12/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentstein 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 01/09100

10
7

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9945957	A	16-09-1999	AU 3328399 A	27-09-1999
			BR 9908599 A	14-11-2000
			CN 1299288 T	13-06-2001
			WO 9945957 A2	16-09-1999
			EP 1064025 A2	03-01-2001
			HU 0101047 A2	30-07-2001
			NO 20004487 A	19-10-2000
			PL 343429 A1	13-08-2001
			TR 200002608 T2	21-11-2000
EP 0314240	A	03-05-1989	EP 0314240 A2	03-05-1989
			JP 1250397 A	05-10-1989
GB 1030777	A	25-05-1966	NONE	

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

14 de Febrero de 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 02/12287 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C07K 14/02,
A61K 39/29, C07K 1/36

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP01/09100

(22) Fecha de Registro Internacional: 7 de Agosto de 2001
(07.08.2001)

(25) Idioma de registro: INGLÉS

(26) Idioma de Publicación: INGLÉS

(30) Información de Prioridad:

0019728.5	10 de Agosto de 2000 (10.08.2000)	GB
0101334.1	18 de Enero de 2001 (18.01.2001)	GB

(71) Solicitante: (para todos los estados designados, excepto Estados Unidos de América): SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(72) Inventores: e

(75) Inventores/Solicitantes (para los Estados Unidos de América únicamente): DE HEYDER, Koen [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). SCHU, Peter [DE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). SERANTONI, Michelle [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). VAN OPSTEL, Omer [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agente: STEPHEN, Robert, J.; Corporate Intellectual Property, SmithKline Beecham, Two New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).

(81) Estados Designados (nacionales): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, ~~CO~~, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Estados Designados (regionales): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— con reporte de búsqueda internacional

— Antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS HBV PARA EL USO EN VACUNAS.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método para la producción de un antígeno de hepatitis B adecuado para el uso en una vacuna, en donde el método comprende la purificación del antígeno en presencia de cisteína, y a vacunas que comprenden dichos antígenos.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/12287 A1

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/02,
A61K 39/29, C07K 1/36

(74) Agent: STEPHEN, Robert, J.; Corporate Intellectual
Property, SmithKline Beecham, Two New Horizons Court,
Brentford, Middlessex, TW8 9EP (GB).

(21) International Application Number: PCT/EP01/09100

(22) International Filing Date: 7 August 2001 (07.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0019728.5 10 August 2000 (10.08.2000) GB
0101334.1 18 January 2001 (18.01.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US):
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.
[BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DE HEYDER,
Koen [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals, Rue de
l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). SCHU, Peter
[DE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals, Rue de l'Institut
89, B-1330 Rixensart (BE). SERANTONI, Michelle
[BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals, Rue de l'Insti-
tut 89, B-1330 Rixensart (BE). VAN OPSTEL, Omer
[BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals, Rue de l'Institut
89, B-1330 Rixensart (BE).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM,
HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PURIFICATION OF HBV ANTIGENS FOR USE IN VACCINES

(57) Abstract: The present invention relates to a method for the production of a hepatitis B antigen suitable for use in a vaccine, the
method comprising purification of the antigen in the presence of cysteine, to vaccines comprising such antigens.

WO 02/12287 A1

13
10

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia Solicitantes o agentes RJS/FL/B45231	SI SE REQUIERE ACCION POSTERIOR	Ver Notificación de Transmisión de Informe de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA/416)
Solicitud Internacional No. PCT/EP01/09100	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 07/08/2001	Fecha de prioridad (día/mes/año) 10/08/2000

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC 7

C07K14/02

Solicitante

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.

1. Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36.
2. Este REPORTE consta de un total de 7 páginas, incluyendo la carátula.

☒ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT).

Estos anexos constan de un total 3 de páginas.

3. Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

I	☒	Bases del reporte
II	☐	Prioridad
III	☒	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial
IV	☐	Falta de unidad de invención
V	☒	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación
VI	☐	Ciertos documentos citados
VII	☐	Ciertos defectos en la solicitud internacional
VIII	☐	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

Fecha de presentación de la demanda 05/03/2002	Fecha de terminación de este reporte 21.11.2002
Nombre y dirección de correo de la autoridad internacional de examen preliminar European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - paises bajos Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax No. (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado Sitch, W Teléfono No. +31 70 340 3040

I. Bases del Reporte

1. Respecto a los elementos de la solicitud internacional: (Carátulas de remplazo que han sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el artículo 14 están referenciados en este reporte como "presentados originalmente" y no están anexos a este reporte dado que no contienen modificaciones (Reglas 70.16 y 70.17):

Descripción, Páginas:

1-29 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, No.:

1-27 con telefax de 15/10/2002

Dibujos, No.:

1/3-3/3 como se presentaron originalmente

2. Respecto al idioma, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma en el cual la solicitud internacional fue presentada, a menos que se indique lo contrario bajo este ítem.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma, el cual es:

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para una búsqueda internacional (según la Regla 23.1 (b)).
☐ el idioma de una publicación de la solicitud internacional (según la Regla 48.3 (b)).
☐ el idioma de la traducción suministrada para el examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).

3. Respecto al nucleótido y/o secuencia amino ácida revelado en la solicitud internacional, se llevó a cabo el examen preliminar internacional según el listado de secuencia:

- ☐ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.
☐ registrado junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.
☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.
☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.
☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual el listado de secuencia escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.
☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual la información presentada en forma legible por computador es idéntica al listado de secuencia escrita.

4. Las modificaciones han resultado en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
☐ las reivindicaciones, Nos.

18
12

☐ los dibujos, páginas

5. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (algunas) de las modificaciones no se hubiesen hecho, ya que se ha considerado que van más allá de la revelación según se presentó, como se indicó en Casilla Suplementaria (Regla 70.2 (c)):

(Cualquier hoja de remplazo que contenga tales modificaciones debe ser referida bajo el ítem 1 y anexada a este reporte.)

6. Observaciones adicionales, si son necesarias:

III. No establecimiento de opinión respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1. La cuestión de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar nivel inventivo (no ser obvio), o ser industrialmente aplicable no se ha examinado en relación con:

☐ toda la solicitud internacional.

☒ las reivindicaciones Nos. 27 con respecto a la aplicabilidad industrial.

porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. se relaciona con el siguiente asunto/materia que no requiere examen preliminar Internacional (*especificar*):

ver hoja anexa

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indican elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):

☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa.

☐ no se ha establecido un informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos.

2. Un examen internacional significativo no puede llevarse a cabo debido a la falla del nucleótido y/o listado de secuencia amino ácida para cumplir con el estándar preparado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas:

☐ el formulario escrito no ha sido proporcionado o no cumple con el estándar.

☐ la forma legible por computador no ha sido proporcionado o no cumple con el estándar.

V. Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)

Sí: Reivindicaciones Independientes 1, 21

16
13

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

	No:	Reivindicaciones Independientes 13, 20, 25, 26, 27
Nivel inventivo (IS)	St:	Reivindicaciones Independientes 1, 21
	No:	Reivindicaciones Independientes 13, 20, 25, 26, 27
Aplicabilidad industrial (IA)	St:	Reivindicaciones Independientes 1, 13, 20, 21, 25, 26,
	No:	Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones

Ver hoja separada

87
14

Re Item III

No establecimiento de opinión con respecto a novedad, nivel inventivo y aplicación industrial

La reivindicación 27 se refiere a materia objeto considerada por esta Autoridad como protegida por las disposiciones de la Regla 67.1 (iv) del PCT. Por consiguiente, no será formulada opinión respecto a la aplicación industrial de la materia objeto de esta reivindicación (artículo 34(4)(a)(i) del PCT).

Re Item V

Declaración razonada bajo el Artículo 35(2) del PCT con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citas y explicaciones que soportan dicha declaración

Los comentarios del solicitante en el trámite hasta la fecha han sido tomados en cuenta.

Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1 : WO9945957

D2 : EP314240

1. Novedad (Art. 33(2) del PCT)

1.1 D1 revela composiciones de vacuna que comprende la combinación de un antígeno de hepatitis B (especialmente el antígeno de superficie, HBsAg), un antígeno viral de herpes simple, y un adyuvante preferencial TH1 (3D-MPL). Ver D1, página 2, línea 2-línea 7; página 8, línea 2- página 9, línea 9; página 16- página 17; ejemplo 1. D1 revela materia objeto que cae dentro del alcance de al menos las reivindicaciones 13, 20, 25, 26, 27 por lo tanto dicho materia objeto carece de novedad.

A este respecto, la novedad de una vacuna de hepatitis B que comprende menos que 0.025ug de Hg por 20ug de proteína es claramente perjudicada por una vacuna que esencialmente carece totalmente de Hg, como se considera el caso en al menos alguna de las realizaciones de D1 (y probablemente el caso de otras numerosas vacunas conocidas de Hepatitis B). Algunos de los antígenos de hepatitis B usados en las formulaciones de vacuna reveladas en D1 pueden tener tiomersal presente (y Hg presente en niveles iguales ó mayores que 0.025ug por 20ug de proteína), por ejemplo el antígeno usado en el producto "Engerix-B" indicado en la página 9 de D1 puede referirse a tal antígeno. Otros antígenos para ser usados en las formulaciones de vacuna (formulaciones tales como las del ejemplo 1 en la página 16) de D1 son sin embargo purificadas por procesos en donde esencialmente el mercurio no esta presente- ver por ejemplo la referencia en la página 8 de D1, y los métodos de purificación para la preparación de antígeno referidos allí - y son en consecuencia considerados como preparaciones de antígeno con menos de 0.025ug de Hg presente por 20ug de proteína.

18
15

Enunciando que dicho antígeno es "obtenido por un método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12" (reivindicación 13), esto es, por purificación en presencia de un agente reductor que tiene un grupo -SH libre, o por purificación en presencia de tiomersal y luego tratamiento con un agente reductor que tiene un grupo -SH libre (reivindicación 25), es además considerada incapaz para distinguir necesariamente el antígeno de la reivindicación en cuestión del que es usado en al menos algunas de las realizaciones de D1.

2. Nivel inventivo (Art. 33(3) del PCT)

2.1 Para la consideración del nivel inventivo, se considera que D2 representa el estado de la técnica más cercano. D2 enfoca el problema de producir (purificar) HBsAg con alto rendimiento y pureza, cuyos antígenos son estables y potentes, usando una técnica rápida y simple. Los procesos usados comprenden varias etapas de purificación, junto con una etapa de solubilización. Diferentes antígenos reductores pueden ser usados en la etapa de solubilización, como se incluye úrea y DTT (Ditiotreitol, un agente reductor con grupo sulfhidrilo libre), cisteína y homocisteína. Ver página 2 de D2; línea 41 - línea 46; página 3, línea 6- línea 13; página 5, línea 37 - página 7, línea 15; página 7, línea 25- página 8, línea 29. La materia objeto de las reivindicaciones independientes 1 y 21 es novedosa sobre D2, y sobre la otra técnica anterior disponible.

La diferencia entre la reivindicación 1 y D2, o entre la reivindicación 21 y D2 es que el antígeno de superficie de hepatitis B es purificado por un proceso tal que el antígeno purificado comprende menos que 0.025ug de Hg por 20ug de proteína, y es purificado en presencia de un agente reductor que tiene un grupo -SH libre, o es purificado en presencia de tiomersal luego tratado con un agente reductor que tiene un grupo -SH libre. Los efectos de este proceso que involucra tales etapas (en donde "tratado con" = "dializado en presencia de") es aparentemente la mayor reducción en contenido de Hg de la preparación del antígeno seguido el tratamiento con el agente reductor que tiene un grupo -SH libre después del uso de tiomersal en el proceso de purificación del antígeno (página 11, descripción).

El problema dirigido por la presente solicitud es el desarrollo de vacunas de hepatitis B, que incluyen métodos de preparación de antígenos para usar en tales vacunas, en donde los problemas potenciales (por ejemplo seguridad) asociados con el uso de tiomersal (un preservativo que contiene mercurio) son evitados en tales vacunas.

En resumen, este problema no es enfocado por D2 y el nivel inventivo de las reivindicaciones 1 y 21 puede así, en principio, ser reconocido sobre la técnica anterior disponible.

3. Para el análisis de las presentes reivindicaciones independientes 13, 20, 26, 27 sobre la cuestión de si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad puede también ser dependiente sobre la formulación de las reivindicaciones. LA EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de reivindicaciones para el uso de un compuesto en tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo reivindicaciones para el primer uso de un compuesto conocido en tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

PATENT COOPERATION TREATY

GlaxoSmithKline
Biologicals SA 17
C-B45231

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To: Stephen, Robert J. SMITHKLINE BEECHAM Corporate Intellectual Property (CN9.25.1) 980 Great West Road Brentford Middlesex TW8 9GS GRANDE BRETAGNE		GlaxoSmithKline Corporate IP Received BRENTFORD 25 NOV 2002		NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT (PCT Rule 71.1)	
ATTY: <u>RJS</u>		IPM: <u>N/A</u> ON <u>UPD</u> <u>DATE OF FILING</u>		21.11.2002	
Applicant's or agent's file reference RJS/FL/B45231		IMPORTANT NOTIFICATION			
International application No. PCT/EP01/09100		International filing date (day/month/year) 07/08/2001		Priority date (day/month/year) 10/08/2000	
Applicant SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.					

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

For the purpose of deciding whether the claimed invention is patentable or not, the elected Offices may apply criteria additional to or different from the criteria on which the international preliminary examination report is based (see Articles 27(5), 33(5)). Additional criteria may include e.g. exemptions from patentability and the requirements of enabling disclosure and of clarity and support of claims.

Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tlx 31 651 epo nl Fax +31 70 340 - 3016	Authorized officer de Haas, B Tel. +31 70 340-4738	
--	---	---

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference RJS/FL/B45231	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/PEA/416)	
International application No. PCT/EP01/09100	International filing date (day/month/year) 07/08/2001	Priority date (day/month/year) 10/08/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K14/02		
Applicant SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

 These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 05/03/2002	Date of completion of this report 21.11.2002
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Palatinlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tlx 31 651 epo nl Fax +31 70 340 - 3016	Authorized officer Slich, W Telephone No. +31 70 340 3040 

22
19

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP01/09100

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17):*

Description, pages:

1-29 as originally filed

Claims, No.:

1-27 with telefax of 15/10/2002

Drawings, No.:

1/3-3/3 as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:

3

23
20

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP01/09100

☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 27 with respect to industrial applicability.

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
see separate sheet
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for the said claims Nos. .

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N) Yes: Claims Independent claims 1, 21

24
21

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP01/09100

	No:	Claims	Independent claims 13, 20, 25, 26, 27
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	Independent claims 1, 21
	No:	Claims	Independent claims 13, 20, 25, 26, 27
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	Independent claims 1, 13, 20, 21, 25, 26
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

25
22

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claim 27 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item V

Reasoned statement under Article 35(2) PCT with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

The comments of the applicant in the proceedings to date have been taken into account.

Reference is made to the following documents:

D1: WO9845957

D2: EP314240

1. Novelty (Art. 33(2) PCT)

1.1 D1 discloses vaccine compositions comprising the combination of a hepatitis B antigen (especially the surface antigen, HBsAg), a herpes simplex viral antigen, and a ¹³20,21 TH1 preferential adjuvant (3D-MPL). See D1, page 2, line 2 - line 7; page 8, line 2 - page 9, line 9; page 16 - page 17; example 1. D1 discloses subject matter falling within the scope of at least claims 13, 20, 25, 26, 27 such subject matter therefore lacking novelty.

In this regard, the novelty of a hepatitis B vaccine comprising less than 0.025ug Hg per 20ug protein is clearly prejudiced by a vaccine essentially lacking Hg altogether, as is considered the case in at least certain of the embodiments of D1 (and likely the case in numerous other known hepatitis B vaccines). Some of the hepatitis B antigens used in the vaccine formulations disclosed in D1 may have thiomersal present (and Hg present at levels equal to or greater than 0.025ug per 20ug protein), for example the antigen used in the product 'Engerix-B' indicated on page 9 of D1 may refer to such an antigen. Other antigens to be used in the vaccine formulations (formulations such as that of example 1 on page 16) of D1 however are purified by processes wherein essentially no mercury is present - see for example the reference on page 8 of D1, and the

purification methods for antigen preparation referenced therein - and are accordingly considered as preparations of antigen with less than 0.025ug Hg present per 20ug protein. Stating that a said antigen is 'obtained by a method of any of claims 1-12' (claim 13), ie by purification in the presence of a reducing agent having a free -SH group, or by purification in the presence of thiomersal and then treatment with a reducing agent having a free -SH group (claim 25), is furthermore considered unable to necessarily distinguish the antigen of the claim in question from that used in at least certain embodiments of D1.

2. Inventive Step (Art. 33(3) PCT)

2.1 For consideration of inventive step, D2 is considered to represent the closest prior art. D2 addresses the problem of producing (purifying) HBsAg at high yield and purity, which antigens are stable and potent, using a rapid and simple technique. The process used comprises various purification steps, together with a solubilisation step. Various reducing agents may be used in the solubilisation step, such including urea and DTT (Dithiotreitol, a reducing agent with a free sulphydryl group), cysteine and homocysteine. See D2 page 2, line 41 - line 46; page 3, line 6 - line 13; page 5, line 37- page 7, line 15; page 7, line 25 - page 8, line 29. The subject matter of independent claims 1 and 21 is novel over D2, and over the other available prior art.

Difference between claim 1 and D2, or between claim 21 and D2 is that hepatitis B surface antigen is purified by a process such that the purified antigen comprises less than 0.025 ug Hg per 20ug protein, and is purified in the presence of a reducing agent having a free -SH group, or is purified in the presence of thiomersal then treated with a reducing agent having a free -SH group. Effects of this process involving such steps (wherein 'treated with' = 'dialysed in the presence of') is apparently the great reduction in Hg content of the antigen preparation following treatment with the reducing agent having a free -SH group subsequent to the use of thiomersal in the antigen purification process (page 11, description).

The problem addressed by the present application is the development of hepatitis B vaccines, including methods of preparation of antigens for use in such vaccines, wherein potential problems (eg safety) associated with the use of thiomersal (a mercury containing preservative) in such vaccines are avoided.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP01/09100

2A
24

In brief, this problem is not addressed by D2, and inventive step for claims 1 and 21 may thus in principle be acknowledged over the available prior art.

3. For the assessment of present independent claims 13, 20, 26, 27 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

28
/b

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Artículo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito Informar a ese Despacho que el capítulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente Invención y en este sentido, no configuran una ampliación del Invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

29
26

PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS HBV PARA EL USO EN VACUNAS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un antígeno de la hepatitis B adecuado para uso en una vacuna, comprendiendo el procedimiento la purificación del antígeno en presencia de cisteína, y a vacunas que comprenden tales antígenos.

PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS HBV PARA EL USO EN VACUNAS

Esta invención se refiere a un nuevo procedimiento de fabricación de una vacuna para la hepatitis B para uso en el tratamiento o profilaxis de las infecciones producidas por el virus de la hepatitis B (HBV). Además, se refiere a una vacuna de HBV que se puede obtener por el nuevo procedimiento de la invención.

La infección crónica por el virus de la hepatitis B (HBV), para la que actualmente el tratamiento es limitado, constituye un problema para la salud pública global de enormes dimensiones. Los portadores crónicos de HBV, que se estiman en más de 3 millones a nivel mundial, tienen riesgo de desarrollar hepatitis crónica activa, cirrosis y carcinoma hepatocelular primario.

Muchas vacunas que están disponibles actualmente requieren un conservante para prevenir el deterioro. Un conservante usado con frecuencia es el tiomersal, que es un compuesto que contiene mercurio. Han surgido algunas cuestiones acerca del uso del mercurio en las vacunas, aunque los informadores han subrayado que los riesgos potenciales de las vacunas que contienen tiomersal no deben sobredimensionarse (Offit; P.A., JAMA Vol. 283; No. 16). Sin

embargo, sería ventajoso encontrar procedimientos nuevos y potencialmente más seguros para preparar vacunas y reemplazar el uso del tiomersal en el procedimiento de fabricación. De esta forma, existe la necesidad de 5 desarrollar vacunas que carezcan de tiomersal, en particular vacunas para la hepatitis B.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un antígeno de la hepatitis B adecuado para uso en una vacuna, comprendiendo el 10 procedimiento la purificación del antígeno en presencia de un agente reductor que comprende un grupo -SH libre.

La presente invención preferiblemente proporciona un procedimiento para producir un antígeno de la hepatitis B estable sin trazas de tiomersal, que comprende la 15 purificación del antígeno en presencia de un agente reductor que tiene un grupo -SH libre.

La preparación de antígeno generalmente carece de tiomersal cuando no se puede detectar tiomersal en el producto antigénico purificado usando espectrofotometría de 20 absorción de mercurio, como se describe en este documento.

La preparación del antígeno de la hepatitis preferiblemente comprende menos de 0,025 µg de mercurio por

20 µg de proteína, medido idóneamente por espectrofotometría de absorción.

Preferiblemente, la purificación se realiza en ausencia de tiomersal y el antígeno purificado carece completamente 5 de tiomersal.

Preferiblemente, el antígeno es estable, de forma conveniente sustancialmente tan estable como un antígeno de la hepatitis purificado en presencia de tiomersal, por ejemplo, como el indicado en el Ejemplo 1 de este documento.

10 Preferiblemente, el antígeno de la hepatitis es inmunogénico.

Preferiblemente, el agente reductor se añade durante el proceso de purificación del antígeno, preferiblemente después del crecimiento de las células que expresan el 15 antígeno.

Preferiblemente el agente reductor es cisteína, ditiotreitól, β-mercaptoetanol o glutatión, siendo el agente más preferido la cisteína.

Por consiguiente, la presente invención preferiblemente 20 proporciona un procedimiento para producir un antígeno de la hepatitis B inmunogénico y estable sin trazas de tiomersal, que comprende la purificación del antígeno en presencia de

cisteína.

Preferiblemente, la purificación se realiza en presencia de una solución de cisteína.

Preferiblemente, la cisteína, en solución o en forma de 5 polvo, se añade durante el proceso a una concentración final comprendida entre 1 y 10 mM, preferiblemente de 1 a 5 mM. Más preferiblemente, la cisteína se añade a una concentración final de aproximadamente 2 mM.

Preferiblemente, la cisteína es L-cisteína.

10 La invención proporciona además un procedimiento para producir un antígeno de la hepatitis B estable sin trazas de tiomersal, en el que el antígeno bruto se somete a cromatografía de exclusión molecular, se somete a cromatografía de intercambio iónico y se mezcla con agente 15 reductor que tiene un grupo -SH libre.

Preferiblemente, la cromatografía de intercambio iónico es una cromatografía de intercambio aniónico.

La invención proporciona además un antígeno de la hepatitis B sin tiomersal que se puede obtener por el 20 procedimiento de fabricación de la presente invención, siendo el antígeno al menos tan inmunogénico y antigénico como el antígeno de la hepatitis B fabricado en presencia de

tiomersal.

La invención proporciona además un antígeno de la hepatitis B inmunogénico que tiene una relación media de proteína por ELISA mayor de 1,5 y un contenido de RFl con un 5 valor de CI50 al menos 3 veces menor que el del antígeno superficial de la hepatitis B fabricado en presencia de tiomersal.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un antígeno de la 10 hepatitis adecuado para uso en una vacuna, comprendiendo el procedimiento la purificación del antígeno en presencia de tiomersal y el tratamiento posterior del antígeno en presencia de un agente reductor que comprende un grupo -SH libre.

15 Convenientemente, el tratamiento va seguido de una etapa de purificación, tal como una etapa de diálisis, para eliminar el tiomersal.

Preferiblemente, el agente reductor es cisteína, DTT, glutatión o 2-mercaptoetanol.

20 El antígeno de la hepatitis B de la invención puede usarse para el tratamiento o profilaxis de infecciones de hepatitis B, especialmente para el tratamiento o profilaxis,

por ejemplo, de infecciones crónicas de hepatitis B.

La presente invención proporciona además una formulación de vacuna que comprende un antígeno de la hepatitis B de la presente invención junto con un adyuvante.
5 Preferiblemente, el adyuvante es una sal de aluminio o un estimulador preferente de la respuesta de las células TH1.

Preferiblemente, el antígeno es un antígeno superficial de la hepatitis B.

La preparación del antígeno superficial de la hepatitis
10 B está bien documentada. Véase, por ejemplo, Harford y col., en Develop. Biol. Standard 54, página 125 (1983), Gregg y col., en Biotechnology, 5, página 479 (1987), los documentos EP-A-0 226 846 y EP-A-0 229 108 y las referencias citadas en estos documentos.

15 Como se usa en este documento, la expresión "antígeno superficial de la hepatitis B" o "HBsAg" incluye cualquier antígeno HBsAg o fragmento del mismo que presente la antigenicidad del antígeno superficial de HBV. Se entenderá que además de la secuencia de 226 aminoácidos del antígeno
20 HBsAg S (véase Tiollais y col., Nature, 317, 489 (1985) y las referencias citadas en este texto), el HBsAg descrito en este documento, si se desea, puede contener todo o parte de

36
B

una pre-secuencia S como la descrita en las referencias anteriores y en el documento EP-A-0 278 940. El HBsAg como se describe en este documento también puede hacer referencia a variantes, por ejemplo, el "mutante de escape" descrito en 5 el documento WO 91/14703.

El HBsAg también puede hacer referencia a los polipéptidos descritos en los documentos EP 0 198 474 o EP 0 304 578.

Normalmente, el HBsAg estará en forma de partículas. En 10 una realización particularmente preferida, el HbsAg constará esencialmente del antígeno HbsAg S mencionado anteriormente en este documento.

La vacuna puede incluir ventajosamente un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como un adyuvante adecuado. 15 Los adyuvantes adecuados están disponibles en el mercado, tales como, por ejemplo, Adyuvante Incompleto y Adyuvante Completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI); Adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); sales de 20 aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados;

polisacáridos modificados catiónica o aniónicamente; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforil lípido A y quil A. También pueden usarse como adyuvantes citocinas, tales como GM-CSF o interleucina-1, -7 o -12.

5 En las formulaciones de la invención, se prefiere que la composición adyuvante induzca una respuesta inmune predominantemente de tipo TH-1. Los altos niveles de citocinas de tipo Th1 (por ejemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-12) tienden a favorecer la inducción de las respuestas
10 inmunes mediadas por células contra un antígeno administrado. Dentro de una realización preferida en la que una respuesta es predominantemente de tipo Th1, el nivel de citocinas de tipo Th1 aumentará en una mayor medida que el nivel de citocinas de tipo Th2. Los niveles de estas
15 citocinas pueden determinarse rápidamente usando ensayos convencionales.

Como revisión de las familias de citocinas, véase Mosmann y Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.

Por consiguiente, los adyuvantes adecuados para uso en
20 la inducción de una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferiblemente monofosforil lípido A 3-des-O-

acilado (3D-MPL) junto con una sal de aluminio. Otros adyuvantes conocidos que inducen preferentemente una respuesta inmune de tipo TH1 incluyen oligonucleótidos que incluyen CpG. Los oligonucleótidos se caracterizan porque el 5 dinucleótido CpG no está metilado. Tales oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/02555. También se describen secuencias de ADN inmunoestimuladoras, por ejemplo, por Sato y col., *Science* 273:352, 1996. Otro adyuvante preferido es una 10 saponina, preferiblemente QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), que puede usarse sola o en combinación con otros adyuvantes. Por ejemplo, un sistema mejorado implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, tal como la combinación de QS21 y 15 3D-MPL como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que la QS21 se inactiva con colesterol, como se describe en el documento WO 96/33739. Otras formulaciones preferidas comprenden una emulsión de aceite en agua y tocoferol. En el documento WO 20 95/17210 se describe una formulación adyuvante particularmente potente que incluye QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua.

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

5 Por consiguiente, en una realización de la presente invención se proporciona una vacuna que comprende un antígeno superficial de la hepatitis B de la presente invención, y que comprende además un adyuvante de inducción de TH-1. Una realización preferida es una vacuna en la que
10 el adyuvante de inducción de TH-1 se selecciona entre el grupo de adyuvantes que comprende: 3D-MPL, QS21, una mezcla de QS21 y colesterol y un oligonucleótido CpG. Otra realización preferida es una vacuna que comprende un antígeno superficial de la hepatitis B con monofosforil
15 lípido A o un derivado del mismo como adyuvantes, QS21 y tocoferol en una emulsión de aceite en agua.

Preferiblemente, la vacuna comprende además una saponina, más preferiblemente QS21. En el documento WO 00/09159 se describe otra formulación adyuvante particular
20 adecuada que incluye CpG y una saponina, y es una formulación preferida. Más preferiblemente, la saponina en esa formulación particular es QS21. Preferiblemente, la

40
37

composición comprende además una emulsión de aceite en agua y tocoferol.

La presente invención proporciona además una formulación de vacuna que comprende el antígeno superficial 5 de la hepatitis B de la presente invención junto con un adyuvante, y que comprende además uno o más antígenos seleccionados entre el grupo compuesto por: toxoide diftérico (D), toxoide tetánico (T), antígenos acelulares de pertussis (Pa), virus de la polio inactivado (IPV), antígeno 10 de haemophilus influenzae (Hib), antígeno de la hepatitis A, virus del herpes simplex (HSV), antígenos de clamidia, GSB, HPV, y antígenos de streptococcus pneumoniae y de neisseria. En la formulación de vacuna de la presente invención también pueden combinarse antígenos que confieren protección para 15 otras enfermedades.

En una realización particular, la formulación de vacuna comprende un antígeno superficial de la hepatitis B que se puede obtener por el procedimiento de fabricación de la presente invención junto con un adyuvante y un virus de la 20 polio inactivado.

La presente invención también proporciona un procedimiento de tratamiento y/o profilaxis de infecciones

41
30

producidas por el virus de la hepatitis B, que comprende administrar a un ser humano o a un animal que sufre o que es susceptible de sufrir una infección por el virus de la hepatitis B, una cantidad segura y eficaz de una vacuna de 5 la presente invención para la profilaxis y/o tratamiento de la infección de hepatitis B.

La invención proporciona además el uso de un antígeno superficial de la hepatitis B de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de 10 pacientes que sufren una infección producida por el virus de la hepatitis B, tal como la infección crónica por el virus de la hepatitis B.

La vacuna de la presente invención contendrá una cantidad inmunoprotectora del antígeno y puede prepararse 15 por técnicas convencionales.

La preparación de vacuna se describe en general en Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach (Diseño de Vacunas - el procedimiento de subunidad y adyuvante), editado por Powell 20 y Newman, Plenum Press, 1995. New trends and Developments in Vaccines (Nuevas Tendencias y Progresos en Vacunas), editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore,

42
31

Maryland, EE:UU. 1978. La encapsulación dentro de liposomas se describe, por ejemplo, por Fullerton, en la Patente de Estados Unidos No. 4.235.877. La conjugación de proteínas con macromoléculas se describe, por ejemplo, por Likhite, en 5 la Patente de Estados Unidos 4.372.945 y por Armor y col., en la Patente de Estados Unidos No. 4.474.757. El uso de Quil A se describe por Dalsgaard y col., Acta Vet Scand, 18:349 (1977). El 3D-MPL está disponible en Ribl Immunochem, EE.UU, y se describe en la Solicitud de Patente británica 10 No. 2220211 y en la Patente de Estados Unidos No. 4912094. La QS21 se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5057540.

La presente invención se ilustra pero no se limita por los siguientes ejemplos, en los que:

15 la Figura 1 ilustra el procedimiento de producción de Engerix B™ sin tiomersal;

la Figura 2 ilustra el análisis por SDS-PAGE de lotes de antígeno a granel; y

la Figura 3 ilustra proteínas de levadura residuales en 20 lotes de antígeno a granel producidos por el procedimiento sin tiomersal.

Ejemplo 1:

Procedimiento de producción del antígeno superficial de la hepatitis B en presencia de tiomersal

El antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg) de la vacuna monovalente de la hepatitis B de SB Biologicals 5 (Engerix B™) se expresa como una proteína recombinante en *Saccharomyces cerevisiae* (véase Harford y col., loc. cit.). La proteína de 24 kD se produce intracelularmente y se acumula en las células de levadura recombinantes. Al final de la fermentación, las células de levadura se recogen y se 10 lisan en presencia de un tensoactivo débil tal como Tween 20 para liberar la proteína deseada. Posteriormente, el homogeneizado celular, que contiene las partículas de antígeno superficial soluble, se prepurifica en una serie de precipitaciones y después se concentra por medio de 15 ultrafiltración.

Después se realiza la purificación adicional del antígeno recombinante en separaciones cromatográficas posteriores. En una primera etapa, el concentrado de antígeno bruto se somete a cromatografía de exclusión 20 molecular en un medio de Sepharose 4B. El tiomersal está presente en el tampón de elución en la etapa de cromatografía de exclusión molecular 4B. El tampón de

41

15

elución tiene la siguiente composición: Tris 10 mM, etilenglicol al 5%, pH 7,0, y 50 mg/l de tiomersal. El tiomersal se incluye en este tampón para controlar la carga biológica. La mayor parte de este tiomersal se retira 5 durante las etapas de purificación posteriores, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, ultracentrifugación y desalificación (exclusión molecular), de forma que las preparaciones de antígeno a granel purificado preparado por el procedimiento original contienen aproximadamente 1,2 µg y 10 menos de 2 µg de tiomersal por 20 µg de proteína.

Usando una matriz de DEAE se realiza una etapa de cromatografía de intercambio iónico, y el conjunto de material obtenido después se somete a una ultracentrifugación en gradiente de cesio en 4 capas de 15 diferentes concentraciones de cloruro de cesio establecidas previamente. Las partículas de antígeno se separan de los constituyentes celulares contaminantes de acuerdo con su densidad en el gradiente y se eluyen al final del proceso de centrifugación. Después se retira el cloruro de cesio de 20 este conjunto por una segunda exclusión molecular en gel de Sepharose.

Cuando el HBsAg se prepara por el procedimiento que

45
42

contiene tiomersal en el tampón de exclusión molecular 4B, se recuperan concentraciones de proteína de más de 30 mg/ml en las fracciones que contienen el HBsAg reunidas procedentes del gradiente de CsCl, que corresponden a una 5 concentración equivalente de HBsAg ensayada por el equipo AUSZYME de Abbott Laboratories.

La etapa de ultracentrifugación con CsCl elimina de forma útil los lípidos residuales, el ADN y los contaminantes proteicos minoritarios, de la preparación de 10 HBsAg. Se realiza por centrifugación zonal en un rotor Ti 15 de Beckman Instruments, Fullerton, California, a una velocidad de 30.000 rpm durante un período de aproximadamente 40 a 60 horas. La muestra a purificar se aplica en capas de solución de CsCl con concentraciones 15 finales de CsCl de 0,75, 1,5, 2,5 y 3,25 M. Al final de la centrifugación, el gradiente se eluye en fracciones. Las fracciones que contienen HBsAg pueden identificarse por absorbancia UV a 280 nm o por el ensayo de diluciones de las fracciones con el equipo AUSZYME. La banda de HBsAg está a 20 una densidad de 1,17 a 1,23 g/cm³.

La solución que contiene el HBsAG purificado se filtra de forma estéril antes de usarse para obtener una

4C
43

formulación de vacuna.

La purificación a partir del lisado de células de lavadura es compleja, ya que el antígeno se produce intracelularmente y se necesita una serie de técnicas de separación destinadas a eliminar diferentes tipos de contaminantes (levaduras) para obtener un antígeno a granel puro. Las etapas de purificación son importantes, ya que el producto a purificar es una partícula de lipoproteína que contiene múltiples copias del polipéptido del antígeno superficial y esta estructura tiene que mantenerse a lo largo de todo el proceso de purificación. Es una particularidad de este procedimiento el hecho de que produzca partículas de antígeno superficial que son completamente inmunogénicas sin necesidad de un tratamiento químico adicional para aumentar la inmunogenicidad (compárese con el documento EPO135435).

Los detalles del procedimiento de producción se describen adicionalmente en la Patente europea 0199698.

Ejemplo 2

20 Producción y caracterización de HBsAg derivado de levaduras por un procedimiento sin tiomersal

1. Producción y purificación de HBsAg derivado de

47
44

levaduras

1.1 Resumen del procedimiento de producción

El antígeno superficial de la hepatitis B puede producirse por fermentación de una cepa apropiada de *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo, la descrita en Harford y col., (loc. cit).

Después de la fermentación a gran escala de la cepa de levadura recombinante, las células se recogen y se lisan en presencia de un tensoactivo débil tal como Tween 20.

Después, el antígeno superficial se aísla por una extracción de múltiples etapas y se sigue exactamente el procedimiento de purificación descrito anteriormente en el Ejemplo 1 hasta la etapa de la primera exclusión molecular en Sepharose 4B.

1.2. Procedimiento de purificación sin tiomersal

En el procedimiento sin tiomersal se han introducido los dos siguientes cambios con respecto al procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

1. El tampón de elución de la cromatografía de exclusión molecular 4B ya no contiene tiomersal.

2. Se añade cisteína (concentración final 2 mM) al conjunto de eluato procedente de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico.

Se descubrió que la omisión del tiomersal del tampón de exclusión molecular 4B puede ocasionar la precipitación de las partículas de HBsAg durante la etapa de centrifugación con gradiente de densidad de CsCl, produciéndose una pérdida 5 de producto y la agregación o acumulación del antígeno recuperado.

La adición de cisteína a una concentración final 2 mM al conjunto de eluato procedente de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico anterior previene la 10 precipitación y la pérdida de antígeno durante la centrifugación con gradiente de densidad de CsCl.

La cisteína es una sustancia preferida para este tratamiento, ya que es un aminoácido que se produce de forma natural y puede eliminarse en la etapa de desalificación 15 posterior en una columna de exclusión molecular usando Sepharose 4BCLFF como matriz de la columna.

No hay más cambios en el procedimiento de fabricación en comparación con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

20 El procedimiento sin tiomersal produce antígeno a granel con una pureza y con propiedades comparables al antígeno procedente del procedimiento del Ejemplo 1.

44
45

1.2a

Se cree que el tiomersal añadido al tampón 4B a una concentración de 50 µg/ml se descompone y que el etil mercurio resultante puede unirse covalentemente a los grupos 5 sulfhidrilo libres de los restos de cisteína de la proteína. La proteína contiene 14 restos de cisteína de los que 7 están localizados entre las posiciones 101 y 150.

Se cree que esta región de la proteína está localizada en la superficie de la partícula y que contiene la región 10 antigénica principal de HBsAg, incluyendo la región a inmunodominante y el sitio de reconocimiento para el anticuerpo monoclonal RF1 (Waters J y col., Postgrad. Med. J., 1987:63 (Suppl. 2): 51-56 y Ashton-Rickardt y Murray J. Med. Virology, 1989:29: 196). El antígeno purificado con 15 tiomersal presente en el tampón de exclusión molecular 4B contiene aproximadamente 0,5-0,6 µg de mercurio después del proceso de purificación. Este mercurio no se retira completamente por una diálisis sencilla.

En un experimento, se midieron 0,56 µg de mercurio por 20 20 µg de proteína en una preparación de antígeno a granel. Esta preparación se dializó durante 16 horas a temperatura ambiente frente a NaCl 100 mM, tampón NaPO₄ 10 mM, pH 6,9.

Al final de la diálisis, se midió una concentración de 0,33 μg de Hg por 20 μg de proteína.

Por el contrario, la diálisis en presencia de un agente reductor tal como L-cisteína a una concentración de 0,1-5,0 5 mg/ml, DTT a una concentración de 50 mM o 2-mercaptoetanol a una concentración de 0,5 M, seguida de una segunda diálisis para eliminar el agente reductor, produce la reducción del contenido de mercurio de la preparación de antígeno a menos de 0,025 μg de mercurio por 20 μg de proteína. Éste es el 10 límite de detección inferior del procedimiento.

El contenido de mercurio se determinó por espectrofotometría de absorción. El antígeno se diluye en una solución que contiene un 0,01% p/v de bicromato potásico ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y un 5% v/v de ácido nítrico. Las soluciones patrón 15 se preparan con tiomersal como fuente de mercurio. La absorción atómica de la muestra y de las soluciones patrón se mide después de la vaporización en un generador de vapor, con un cátodo específico de mercurio a 253,7 nm. Como blanco, se mide la absorción atómica del líquido de 20 dilución. El contenido de mercurio de la muestra se calcula por medio de las curvas de calibración obtenidas a partir de las soluciones patrón. Los resultados se expresan como μg de

mercurio por 20 µg de proteína.

1.3 Producción de antígeno a granel sin tiomersal

En la Figura 1 se muestran las etapas del procedimiento para la purificación del antígeno a granel.

5 1.4 Composición de vacuna formulada sin tiomersal

En la Tabla 1 se proporciona una composición cuantitativa típica para una vacuna de hepatitis B sin conservante y formulada a partir del antígeno preparado por el procedimiento sin tiomersal.

Tabla 1:

Constituyente	Cantidad por ml
Constituyente activo - Proteína de la que al menos el 95% es HBsAg	20 µg
Hidróxido de aluminio (adsorbente) (expresado como Al ₂ O ₃)	0,95 mg
Cloruro sódico	9,0 mg (máximo)
Fosfato disódico dihidrato	0,98 mg
Dihidrógeno fosfato sódico dihidrato	0,71 mg
Agua para inyección c.s. hasta	1,0 ml

La composición puede variarse por la adición de 3D-MPL y/u otros adyuvantes.

5 2. Caracterización del antígeno a granel y de la vacuna producida por el procedimiento sin tiomersal

2.1 Ensayos y análisis del antígeno a granel purificado

2.1.1 Base comparativa

Se prepararon tres lotes de antígeno a granel por el 10 procedimiento sin tiomersal de acuerdo con este ejemplo (Ejemplo 1.2) y se identifican como HEF001, HEF002 y HEF003.

Estos lotes se compararon con un lote de antígeno a granel (HEP2055) preparado por el procedimiento previo (como se describe en el Ejemplo 1) en presencia de tiomersal.

2.1.2 Ensayos y análisis del antígeno a granel

5 Se ensayaron los tres lotes de antígeno a granel producidos por el procedimiento sin tiomersal y los resultados se resumen en la Tabla 2.

El contenido de proteína se midió por el procedimiento de Lowry y col., (J. Biol. Chem. 1951:193:265).

10 El contenido de endotoxinas se midió por una técnica de coagulación de gel de Limulus usando un equipo disponible en el mercado de Cape Cod Associates, 704 Main St., Falmouth, MA 02540, EE.UU. El reactivo se estandariza frente al Patrón de Referencia de Endotoxinas de US Pharm.

15 El Tween 20 se midió por el procedimiento de Huddleston y Allred (J. Amer. Oil Chemist Soc., 1965:42:983).

El contenido de HBsAg se midió por el equipo AusZYME disponible en el mercado, de Abbott Laboratories, One Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, EE.UU. Se empleó el
20 procedimiento de ensayo B del fabricante. Como patrón se usó un lote del antígeno a granel purificado por el procedimiento que contenía tiomersal para establecer la

84
51

curva de dosis-respuesta.

Los polisacáridos se midieron por el procedimiento de Dubois y col. (Anal. Chem. 1956:28:350).

Los lípidos se midieron usando un equipo disponible en el mercado (Merkotest Total Lipids 3321) de E. Merck. B.P. 4119, Darmstad D-6100, Alemania.

El contenido de ADN se midió por el procedimiento de Threshold usando aparatos y reactivos disponibles en Molecular Devices Corp., Gutenbergstraße 10, Ismaning, 10 Munich, Alemania.

Los valores encontrados en los ensayos y en los análisis están en el intervalo observado para los lotes de antígeno a granel fabricados usando tiomersal en el tampón de elución de la etapa de exclusión molecular en Sepharose 15 4B, con la excepción de la actividad antigénica obtenida por ELISA. Los valores de esta medición para las tres preparaciones de HEF son mayores (1,63-2,25) que los encontrados para el lote de antígeno a granel HEP2055, que tiene una relación de ELISA/proteína de 1,13. Las relaciones de ELISA/proteína medidas por el equipo AUSZYME para los lotes de antígeno a granel que contenían tiomersal generalmente son de aproximadamente 1,0, están dentro del

52

intervalo de 0,8-1,2 y muy rara vez exceden de 1,4.

2.1.3. Análisis en gel de SDS-PAGE

La preparaciones de antígeno a granel se ensayaron por análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras y con tinción 5 con azul de Coomassie. Todas las muestras mostraron una banda principal a 24K con pequeñas cantidades de una proteína dimérica. Se consideró que las muestras tenían una alta pureza (> 99%), lo cual se evaluó por la ausencia de bandas visibles de proteínas contaminantes.

10 Las muestras (1 µg) de las preparaciones de antígeno a granel se ensayaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras y con tinción con plata (Figura 2). En las condiciones reductoras, las muestras mostraron una banda intensa que migraba a 24K con pequeñas cantidades de formas 15 diméricas y multiméricas. Los modelos del gel son indistinguibles de los del HEP2055 utilizado como comparador. Las muestras también se procesaron en condiciones no reductoras. En estas condiciones, menos material migra a 24K y aumenta la cantidad de polipéptido 20 que migra a las posiciones diméricas y multiméricas. Los lotes de antígeno a granel sin tiomersal parecen tener un grado de polimerización algo mayor que el lote del

67
53

comparador HEP2055.

La identidad del polipéptido de 24K revelada por tinción con azul de Coomassie o con plata se confirmó por transferencia de Western con anticuerpos policlonales de 5 conejo activados contra HBsAg en plasma. Las preparaciones de antígeno a granel muestran una banda principal a 24K junto con formas diméricas y triméricas. La técnica revela pequeñas cantidades de productos de degradación de la proteína antigénica superficial. No hay ninguna diferencia 10 entre el antígeno a granel preparado por el procedimiento sin tiomersal y el lote HPE2055.

La presencia de proteínas de levadura residuales se ensayó por análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras y por transferencia de Western con antisuero policlonal de 15 conejo activado contra proteínas de levadura (Figura 3). La técnica es cualitativa y no permite la cuantificación de las impurezas.

Para los tres lotes de antígeno a granel preparados por el procedimiento sin tiomersal y para el lote HPE2055 se 20 muestra un modelo de bandas constante con una excepción.

La banda de tinción fuerte presente a $\pm 23K$ en el antígeno a granel del lote HPE2055 está prácticamente

57
5A

ausente en las tres preparaciones HEF. La transferencia de Western demuestra que el procedimiento de purificación sin tiomersal produce un producto antigénico más puro.

Tabla 2: Resultados de los ensayos y análisis del antígeno a 5 granel sin tiomersal purificado

ENSAYO	RESULTADOS			
	HEF001	HEF002	HEF003	HEF2055
pH	6,8	6,8	6,8	6,8
Contenido de proteína por Lowry	1312 µg/ml	888 µg/ml	913 µg/ml	995 µg/ml
Contenido de endotoxinas	< 0,25 EU	< 0,25 EU	< 0,25 EU	< 0,25 EU
Contenido de Tween 20	7,1 µg	6,6 µg	7,4 µg	5,8 µg
Actividad antigénica por ELISA	2957 µg/ml	1505 µg/ml	1486 µg/ml	1128 µg/ml
Relación ELISA/proteína	2,25	1,69	1,63	1,13
Contenido de polisacáridos	0,33 µg	0,35 µg	0,33 µg	0,34 µg
Contenido de Lípidos	13,7 µg	12,8 µg	12,9 µg	11,8 µg
Contenido de ADN por Threshold	< 1 pg	< 1 pg	< 1 pg	< 1 pg

2.1.4. Otros ensayos y análisis bioquímicos

2.1.4.1. Contenido de ADN

El contenido de ADN de los tres lotes de antígeno a 10 granel se midió por el procedimiento de Threshold (Molecular Devices Corp). Las cantidades medidas fueron menores de 10 pg de ADN por 20 µg de proteína (Tabla 2); el mismo nivel de contenido de ADN observado con el antígeno a granel producido por el procedimiento actual aprobado.

2.1.4.2 Composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos de los tres lotes de antígeno a granel HEF se determinó después de una hidrólisis ácida con HCl 6 N, por cromatografía de los aminoácidos en una columna de intercambio iónico con detección con ninhidrina después de la columna. No se determinaron ni la prolina ni el triptófano. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Las composiciones encontradas están de acuerdo con la determinada en HEP2055 y con la composición esperada por la secuencia de ADN. Aunque el número de restos de glicina medidos para HPE2055 es parecido al de la composición esperada, normalmente se mide un valor de 16 a 17 restos para las preparaciones de antígeno a granel. El número medio encontrado de restos de cisteína es de 14, que coincide con el número esperado, lo cual demuestra que no se unen cisteínas extra a la partícula como resultado del tratamiento en la etapa con el gradiente de CsCl.

2.1.4.3 Cuantificación de cisteínas libres

La cantidad de cisteínas libres presentes en las preparaciones de antígeno a granel obtenidas de acuerdo con el procedimiento descrito se midió después de la oxidación

de las partículas con ácido per fórmico sin hidrólisis ácida previa. Los restos de cisteína libres oxidados se separaron en una columna de intercambio iónico con una detección por ninhidrina después de la columna. El límite de detección de 5 cisteína por este procedimiento es de 1 μg por ml.

No pudieron medirse cisteínas libres en las tres preparaciones de antígenos HEF cuando se ensayaron a las concentraciones iniciales de proteína indicadas en la Tabla 2.

10 La técnica mide tanto los restos de cisteína libres presentes en el tampón como los restos de cisteína que están unidos a la proteína HBsAg por enlaces disulfuro, pero que no forman parte de la secuencia polipeptídica.

2.1.4.4 Análisis de la secuencia N-terminal

15 La presencia de posibles contaminantes proteicos y productos de degradación en los tres lotes de antígeno a granel producidos por el procedimiento modificado se evaluó por medio de un análisis de la secuencia N-terminal basado en la degradación de Edman. Se detectó la secuencia N-
20 terminal MENITS... de la proteína HBsAg sin interferencia de otras secuencias. También se confirmó que la metionina N-terminal estaba bloqueada en un 60-75% por acetilación, como

60
57

se ha observado previamente para el polipéptido HBsAg producido por el procedimiento rutinario.

Tabla 3: Composición de aminoácidos de HBsAg

Amino ácido	HEF001	HEF002	HEF003	Comp. media	HEP2055	Comp. esperada
Asp	11,3	11,3	11,3	11,3	11,5	10
Thr	17,5	17,4	17,2	17,4	17,8	17
Ser	21,4	21,6	21,4	21,5	20,9	23
Glu	11	11	11	11,0	10,5	9
Pro	nd	nd	nd		nd	24
Gly	17,1	16,8	16,7	16,9	14,6	14
Ala	7,5	7,4	7,4	7,4	7,2	6
Cys	12,3	14,85	14,9	14,1	13,2	14
Val	10,9	11	10,9	10,9	10,7	11
Met	6,8	6,7	7,1	6,9	7,1	6
Ile	12,3	12,4	12,5	12,4	12,2	16
Leu	26,3	26,6	26,2	26,4	26,7	33
Tyr	6,8	6,8	6,8	6,8	7	6
Phe	13,8	13,9	13,8	13,8	13,9	15
His	3	2,8	3,3	3,0	3,3	1
Lys	4	4	3,9	4,0	4,2	3
Arg	5,7	5,8	5,7	5,7	6,1	5
Trp	nd	nd	nd		nd	13

61
53

5

10

15

2.1.4.5. Análisis de dispersión de luz láser

Se realizaron comparaciones de los tamaños de las partículas entre las partículas de HBsAg producidas usando el procedimiento modificado y el lote de referencia HEP2055 20 por medio de dispersión de luz láser (Tabla 4).

Los pesos moleculares medios determinados muestran una buena coherencia entre las preparaciones.

22
51

Tabla 4: Pesos moleculares de partículas de HBsAg por dispersión de luz láser

Lote de antígeno	PM (Daltons)
HEF001	$3,07 \times 10^6$
HEF002	$2,76 \times 10^6$
HEF003	$2,76 \times 10^6$
HEP2055	$3,34 \times 10^6$

5

2.1.4.6 Microscopía electrónica

10 Las preparaciones de antígeno a granel se examinaron por microscopía electrónica después de la fijación y la tinción con acetato de uranilo.

Las partículas observadas fueron similares en todas las muestras y se ajustaron a las partículas subesféricas o de 15 tipo guijarro de ± 20 nm típicas de HBsAg. Las partículas observadas en los tres lotes HEF fueron indistinguibles de las del lote HPE2055.

2.1.5. *Análisis inmunológicos*

2.1.5.1. Reactividad con el anticuerpo monoclonal RF1

Las tres preparaciones de antígeno a granel se ensayaron con respecto a su reactividad con el anticuerpo monoclonal RF1 por un ensayo de inhibición ELISA. Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal RF1 protege a los chimpancés contra la exposición a HBV y se considera que reconoce un epítipo conformacional protector presente en la partícula de HBsAg (Iwarson S y col., 1985, J. Med. Virol., 10 16:89-96).

El hibridoma RF1 puede propagarse en la cavidad peritoneal de ratones BalbC o en cultivos de tejidos.

Se mezcló fluido ascítico diluido a 1/50.000 en tampón de saturación (PBS que contenía un 1% de BSA y un 0,1% de Tween 20) en una proporción 1:1 con diversas diluciones en PBS de las muestras de HBsAg a ensayar (variando las concentraciones finales entre 100 µg y 0,05 µg/ml).

Las mezclas se incubaron en Inmunoplasmas Nunc (96U) durante 1 hora a 37°C antes de transferirse durante 1 hora a 37°C a placas recubiertas con una preparación convencional de HBsAg. La preparación convencional de HBsAg era un lote de antígeno a granel (Hep 286) purificado por el

64
61

procedimiento que contenía tiomersal. Después de una etapa de lavado con PBS que contenía un 0,1% de Tween 20, se añadió IgG de oveja anti-ratón conjugada con biotina diluida a 1/1000 en tampón de saturación y la mezcla se incubó 5 durante 1 h a 37°C. Después de una etapa de lavado, se añadió complejo de estreptavidina-peroxidasa biotinilada diluido a 1/1000 en tampón de saturación a los mismos pocillos y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron y se incubaron con una solución de OPDA al 0,04% y H₂O₂ al 0,03% en tampón citrato 0,1 M, pH 4,5, durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 N, se midieron las densidades ópticas (D.O.) a 490/630 nm y se representaron gráficamente.

La CI50, definida como la concentración de antígeno 15 (concentración de inhibidor) que inhibe el 50% de la unión del anticuerpo al HBsAg que recubre las placas, se calculó usando una ecuación de 4 parámetros y se expresa en ng/ml.

También se ensayó una serie de lotes de antígeno HEP, incluyendo HEP2055, junto con el antígeno gD del herpes 20 simplex como control negativo. El ensayo mide la capacidad de cada antígeno de ensayo de inhibir la unión de RF1 a una preparación de antígeno convencional (HEP286) unida a placas

65
61

de microvaloración.

La Tabla 5 proporciona las concentraciones de cada antígeno que, como se descubrió, inhiben el 50% de la unión de RF1 al antígeno fijado.

66
63

Tabla 5: Inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal RF1 a HBsAg

Antígeno a granel	CI50 (ng/ml)*
HEP286	3834
HEP673	3437
HEP720	3150
HEP2055	2384
HEF001	488
HEF002	574
HEF003	540

5

10

* CI50 = concentración de antígeno (ng/ml) que inhibe el 50% de la unión de RF1 al antígeno fijado.

Los resultados demuestran que se requiere una cantidad de antígeno HEF de 4 a 7 veces menor para inhibir la unión de RF1 (Tabla 5).

67
61

Esto demuestra que el antígeno preparado por el procedimiento modificado tiene una mayor presentación del epítopo RFl que el antígeno HEP a granel.

Se realizó el mismo tipo de ensayo de inhibición usando 5 suero humano procedente de individuos vacunados con Engerix B™ en lugar del mAb RFl y no reveló ninguna diferencia entre los lotes de antígeno HEP y los antígenos HEF.

2.1.5.2. Afinidad de unión al anticuerpo monoclonal RFl

Los parámetros cinéticos de la unión del anticuerpo 10 monoclonal RFl a los 3 lotes de antígeno HEF y a HEP2055 se midieron por resonancia superficial de plasmón usando un aparato Biacore 2000 de Amersham Pharmacia Biotech, Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, Reino Unido.

Los parámetros cinéticos medidos fueron:

15 ka: la constante de la velocidad de asociación ($M^{-1}S^{-1}$)

kd: la constante de la velocidad de disociación (S^{-1})

ka: la constante de equilibrio o afinidad (M^{-1})

K_a

donde $K_a =$

$$\frac{K_a}{K_d}$$

Los valores encontrados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Constantes de afinidad de la unión de RFl a HBsAg

Antígeno a granel	k_a ($\times 10^{-9}$)	k_d ($\times 10^5$)	K_a ($\times 10^{-7}$)
HEF001	6,81	3,21	21,97
HEF002	6,89	3,73	18,83
HEF003	7,39	4,67	15,80
HEP2055	3,31	6,30	5,31

5

Los tres lotes de antígeno HEF proporcionan constantes de asociación/disociación y valores de afinidad de unión similares. Por el contrario, HEP2055 tiene una afinidad 10 menor por la unión a RF1.

Esto es coherente con los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición ELISA, que demostraron que el antígeno preparado por el procedimiento sin tiomersal tenía una mayor presentación del epítipo de RF1.

15 2.2 Ensayo y análisis de la vacuna formulada con el antígeno producido por el procedimiento modificado

Los tres lotes de antígeno HEF se adsorbieron sobre hidróxido de aluminio y se formularon como vacunas de acuerdo con la composición mostrada en la Tabla 1. La presentación es en la dosis adulta en viales (20 µg de 5 proteína antigénica en 1 ml). Los lotes se identifican como DENS001A4, DENS002A4 y DENS003A4.

La potencia de la vacuna se midió por un ensayo del contenido de antígeno in vitro usando el equipo AUSZYME ELISA de Abbott Laboratories y un lote clásico de vacuna 10 formulada con 50 µg/ml de tiomersal como patrón. La potencia de la vacuna se midió usando el procedimiento B como se describe en PharmaEuropa Special Issue Bio97-2 (Diciembre de 1997). Los tres lotes HEF proporcionaron altos valores para el contenido de antígeno, casi dos veces mayores que el 15 contenido indicado de 20 µg de proteína antigénica.

2.2.1 Reactividad de la vacuna DENS con el anticuerpo monoclonal RF1

La antigenicidad de la vacuna adsorbida se ensayó adicionalmente en un ensayo de inhibición con el anticuerpo 20 monoclonal RF1. El ensayo mide la capacidad de la muestra de la vacuna para inhibir la unión de RF1 al antígeno a granel fijado (HEP286).

Se mezcló fluido ascítico diluido a 1/50000 en tampón de saturación (PBS que contenía un 1% de BSA y un 0,1% de Tween 20) en una proporción 1:1 con diversas diluciones en PBS de las muestras de vacuna a ensayar (variando la 5 concentración entre 20 µg y 0,05 µg/ml).

Las mezclas se incubaron en Inmunoplasmas Nunc (96U) durante 2 horas a 37°C con agitación antes de transferirse a placas recubiertas con HBsAg. La preparación de HBsAg usada para el recubrimiento era un lote de antígeno a granel (Hep 10 286) purificado por el procedimiento que contenía tiomersal. Después, estas placas se incuban durante 2 horas a 37°C con agitación. Después de una etapa de lavado con PBS que contenía un 0,1% de Tween 20, se añadió IgG de oveja anti-ratón conjugada con biotina diluida a 1/1000 en tampón de 15 saturación y la mezcla se incubó durante 1 h a 37°C. Después de una etapa de lavado, se añadió complejo de estreptavidina-peroxidasa biotinilada diluido a 1/1000 en tampón de saturación a los pocillos y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron y se incubaron 20 durante 20 minutos a temperatura ambiente con una solución que contenía OPDA al 0,04% y H₂O₂ al 0,03% en tampón citrato 0,1 M, pH 4,5. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 N, se

71
63

midieron las densidades ópticas (D.O.) a 490/630 nm y se representaron gráficamente.

La CI50, definida como la concentración de antígeno (concentración de inhibidor) que inhibe el 50% de la unión del anticuerpo al HBsAg que recubre las placas, se calculó usando una ecuación de 4 parámetros y se expresa en ng/ml.

La vacuna preparada a partir del antígeno a granel producido por el procedimiento modificado se comparó con la vacuna Engerix B™ formulada a partir del antígeno a granel HEP clásico y sin tiomersal como conservante.

Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los resultados se presentan en la Tabla 7 y demuestran que se requiere aproximadamente la mitad de la cantidad de vacuna DENS para conseguir una inhibición del 50% de la unión a RF1 en comparación con la vacuna Engerix B™ sin conservante. Esto refleja una mayor presentación del epítipo de RF1 en el antígeno HEF/DENS y es coherente con los ensayos realizados con el anticuerpo RF1 en el antígeno a granel purificado.

20 Tabla 7 Inhibición de la unión de RF1 por la vacuna
 formulada

32
61

Lote de vacuna	CI -50 (ng/ml) ⁽¹⁾			
	Experimento			Media
	1	2	3	
DENS001A4	913	882	803	726
DENS002A4	888	715	521	708
DENS003A4	817	685	582	695
ENG5100A2	1608	1514	1481	1534
ENG3198B9	1329	1170	1286	1262
ENG3328A9	1417	1194	1334	1315

5

(1) concentración de vacuna que inhibe el 50% de la unión
10 del anticuerpo RF1 al antígeno fijado.

2.2.2 Inmunogenicidad de la vacuna DENS en ratones

Se realizó un estudio en ratones Balb/C para comparar
la inmunogenicidad de los tres lotes de consistencia DENS
con la vacuna Engerix B™ producida de acuerdo con el
15 procedimiento actual de fabricación del antígeno y formulada

33
0

con tiomersal.

Se ensayaron los siguientes lotes:

No. DENS001A4

No. DENS002A4

5 No. DENS003A4

No. ENG2953A4/Q como referencia

En resumen, se inmunizaron grupos de 12 ratones por vía intramuscular, dos veces, a intervalos de 2 semanas, con dosis de vacuna correspondientes a 1/10 (2 µg) o 1/50 (0,4 10 µg) de la dosis usada para seres humanos adultos. La respuesta de anticuerpos a HBsAg y el perfil isotípico inducido por la vacunación se controlaron a partir del suero extraído en el día 28.

DISEÑO EXPERIMENTAL

15 Se inmunizaron grupos de 12 ratones Balb/C por vía intramuscular en las dos patas traseras (2x50µl) en los días 0 y 15 con las siguientes dosis de vacuna:

34
71

Tabla 8: Grupos y dosis de vacuna

Grupo	Vacuna	Volumen	Dosis de antígeno
1	DENS001A4	100µl	2µg
2	→ Diluido 5X en PO4/NaCl	100µl	0,4µg
3	DENS002A4	100µl	2µg
4	→ Diluido 5X en PO4/NaCl	100µl	0,4µg
5	DENS003A4	100µl	2µg
6	→ Diluido 5X en PO4/NaCl	100µl	0,4µg
7	ENG2953A4/Q	100µl	2µg
8	→ Diluido 5X en PO4/NaCl	100µl	0,4µg

5

En los días 15 (2 semanas después de la inmunización I) 10 y 28 (2 semanas después de la inmunización II), se extrajo sangre a partir del seno retroorbital.

Para el diseño de este experimento (4 formulaciones x 2 dosis con 12 ratones por grupo), la potencia se estimó a priori con el programa estadístico PASS. El programa estadístico PASS (Power and Sample Size (Potencia y Tamaño de la Muestra)) se obtuvo en NCSS, 329 North 1000 East,

Kaysville, Utah 84037. Para el análisis de varianza de 2 vías, pudo detectarse una diferencia de GMT de 2,5 veces entre las formulaciones, con un error alfa del 5% y con una potencia > 90%.

5 RESULTADOS

Serología:

Las respuestas humorales (IgG total e isotipos) se midieron por un ensayo ELISA usando HBsAg (Hep286) como antígeno de recubrimiento y anticuerpos anti-ratón conjugados con biotina para revelar la unión a anticuerpos anti-HBs. Sólo se analizó el suero obtenido después de la inmunización II.

La Tabla 9 muestra las respuestas de anticuerpos Ig anti-HBs media y GMT en los sueros individuales dos semanas después de la inmunización II.

Las formulaciones DENS y las formulaciones clásicas de la hepatitis B inducen respuestas de anticuerpos comparables: variando el valor de GMT entre 2304 y 3976 EU/ml para los lotes DENS en comparación con el valor de 2882 EU/ml para la vacuna monovalente de la hepatitis B de SB Biologicals (Engerix B™) a la dosis de 2 µg, y variando los valores de GMT entre 696 y 1182 EU/ml para los lotes

73

DENS en comparación con el valor de 627 EU/ml para la vacuna monovalente de la hepatitis B de SB Biologicals (Engerix B™) a la dosis de 0,4 µg.

- Como era de esperar, se observa un claro efecto de intervalo de dosificación de antígeno para todas las formulaciones a las dosis de 2 µg y 0,4 µg, con una diferencia de 3 a 6 veces en GMT.
- Se observaron cuatro ratones no respondedores (titulaciones < 50EU/ml) sin asociaciones claras con las dosis de antígeno ni con los lotes usados para la inyección (Grupos 1, 2, 3 y 8; un ratón por grupo). Basándose en el análisis estadístico (Ensayo de Grubbs), estos ratones se desecharon del análisis adicional.

Tabla 9 Respuesta de anticuerpos en ratones en el día 28 (2 semanas después de la inmunización II)

72
74

Grupo	Vacuna	Dosis	Número	TITULACIONES ELISA	
				Media	(lg) GMT
1	DENS001A4	2 µg	11	3466	2971
2		0,4 µg	11	1283	1182
3	DENS002A4	2 µg	11	2436	2304
4		0,4 µg	12	984	786
5	DENS003A4	2 µg	12	4583	3976
6		0,4 µg	12	997	696
7	ENG2953A4/Q	2 µg	12	3999	2882
		0,4 µg	11	737	627

5

Análisis estadístico:

10 Se realizó un análisis de varianza de 2 vías sobre las
titulaciones anti-HBs después de la transformación
logarítmica de los datos obtenidos después de la
inmunización II, usando las vacunas (4 lotes) y las dosis de
antígeno (2 µg y 0,4 µg) como factores. Este análisis
15 confirmó que se observaba una diferencia estadísticamente

208
75

significativa entre las dos dosis de antígeno (valor $p < 0,001$) y no mostró ninguna diferencia significativa entre los lotes de vacuna (valor $p = 0,2674$). Como se ha mencionado previamente, la potencia se estimó a priori y el 5 diseño del experimento fue tal que pudo detectarse una diferencia de GMT de 2,5 veces con un error alfa del 5% entre las formulaciones, con una potencia $>90\%$.

Perfil isotípico:

La Tabla 10 muestra el reparto isotípico (IgG1, IgG2a e 10 IgG2b) calculado a partir de un análisis del suero reunido después de la inmunización II.

- Como era de esperar, estas vacunas basadas en alumbre inducen una clara respuesta TH2, ya que se observan principalmente anticuerpos IgG1.
- 15 No se observa ninguna diferencia entre los lotes DENS o la vacuna monovalente de la hepatitis B de SB Biologicals en términos del perfil isotípico.

Tabla 10 Reparto de isotipos de IgG en suero reunido del

día 28

39
25

Grupo	Vacuna	Dosis	Isotipo (%)		
			IgG1	IgG2a	IgG2b
1	DENS001A4	2 µg	91	4	5
2		0,4 µg	87	8	5
3	DENS002A4	2 µg	97	2	1
4		0,4 µg	87	6	7
5	DENS003A4	2 µg	98	1	1
6		0,4 µg	93	4	3
7	ENG2953A4/Q	2 µg	88	8	4
		0,4 µg	88	9	3

5

10 *Ejemplo 3 Formulación de vacunas combinadas*

El antígeno a granel de la invención es particularmente adecuado para la formulación en una vacuna combinada que comprende IPV.

Los estudios de estabilidad realizados en lotes 15 iniciales de una vacuna combinada DTPa-HBV-IPV indicaron una

80
27

reducción de la potencia del componente IPV, particularmente del antígeno de la poliomielitis de tipo 1, cuando se usa un inmunoensayo *in vitro* (determinación del contenido de antígeno D por ELISA) y un ensayo de potencia en rata *in vivo*. No se observó pérdida de potencia para el tipo 3. Para el tipo 2, la pérdida de potencia estuvo dentro del intervalo esperado (no más de un 10% de pérdida por año de almacenamiento).

Los estudios se iniciaron para determinar la causa de esta pérdida de potencia en la vacuna combinada DTPa-HBV-IPV. A partir de la observación de que la estabilidad de IPV en la vacuna DTPa-IPV de SB Biologicals es satisfactoria (una pérdida de contenido de antígeno no mayor del 10% por año de almacenamiento), se concluyó que era probable que el componente HBV fuera el responsable de la inestabilidad de IPV en la vacuna DTPa-HBV-IPV.

El componente HPV usado en la formulación inicial de DTPa-HBV-IPV inicial es el HBsAg derivado de levadura purificado a partir de ARNr, usado también para la fabricación de la vacuna monovalente de la hepatitis B de SB Biologicals y preparado como se describe en el Ejemplo 1.

Como primer intento para determinar el elemento del

81
72

componente de HBV que era perjudicial para IPV, el HBsAg a granel se analizó con respecto a la presencia de tiomersal. Previamente se ha descubierto (Davisson y col., 1956, J. Lab. Clin. Med. 47:8-19) que el tiomersal usado como
5 conservante en las vacunas DTP "era perjudicial para el virus de la poliomiелitis" en una combinación DTP-IPV. Esta observación se consideró por los fabricantes de la vacuna que han reemplazado el tiomersal por otros conservantes para formular sus vacunas que contienen IPV. Más recientemente,
10 se volvió a investigar el efecto del tiomersal sobre la potencia de IPV en condiciones de almacenamiento a largo plazo a +4°C. Se informó la pérdida de potencia del antígeno del virus de la polio de tipo I a niveles indetectables después de 4-6 meses (Sawyer, L.A. y col., Vaccine 12: 851-
15 856).

Usando espectroscopía de adsorción atómica, se detectaron aproximadamente 0,5 µg de mercurio (Hg) por 20 µg de HBsAg en un antígeno purificado de acuerdo con el Ejemplo 1.

20 Esta cantidad de mercurio (en forma de tiomersal y cloruro de etilmercurio, el producto de degradación del tiomersal) puede reducir a niveles indetectables el ELISA

82
79

responsable del contenido de antígeno D de tipo 1 en un concentrado a granel de IPV incubado a 37°C durante 7 días.

Se estableció un procedimiento para liberar el mercurio presente en el HBsAg a granel. Se postuló que el mercurio 5 podía estar unido a los grupos tiol de las partículas de HBsAg y que, por lo tanto, podía liberarse en presencia de agentes reductores. Después de la experimentación con otros agentes reductores, se seleccionó la L-cisteína como agente para liberar el mercurio de las partículas de HBsAg. Después 10 de una diálisis del HBsAg a granel frente a solución salina que contenía L-cisteína a una concentración de 5,7 mM, no se detectó mercurio en el material retenido (límite de detección del procedimiento de ensayo: 25 ng de Hg/20 µg de HBsAg). El antígeno dializado se mezcló con concentrado a 15 granel de IPV y la estabilidad del virus de tipo 1 se evaluó midiendo el contenido de antígeno D después de la incubación a 37°C durante 7 días. Como controles se usaron el concentrado a granel de IPV no mezclado y mezclado con HBsAg no tratado con cisteína. La titulación de ELISA de 20 referencia se obtuvo en las muestras almacenadas a una temperatura de +2°C a +8°C durante 7 días. Los resultados se resumen en la Tabla 11:

TABLA 11

Muestra	Contenido de antígeno D (tipo 1) ¹		Pérdida
	7 días/4°C	7 días/37°C	
IPV (no mezclado)	31,6	24,2	23%
IPV + HBsAg no tratado	31,1	18,1	42%
IPV + HBsAg-tratado con cisteína	31,4	27,6	12%
IPV + tiomersal (1 µg/ml)	30,5	11,0	74%

(1) Expresado en unidades de antígeno D (DU)

Los datos obtenidos en estas preparaciones de laboratorio demuestran claramente que la estabilidad del virus de la polio de tipo 1 se mejora significativamente si el HBsAg se trata con cisteína para eliminar el mercurio residual antes de mezclarse con IPV.

Los datos presentados anteriormente también muestran una pérdida del contenido de antígeno D del 23% para la preparación de IPV de referencia después la incubación durante 7 días a 37°C. Esto confirma la inestabilidad intrínseca del virus de la polio de Mahoney de tipo 1, como se ha notificado previamente (Sawyer, L.A. y col. (1994), Vaccine 12: 851-856).

Aunque los lotes comerciales de las vacunas DTPa-HBV-

84
21

IPV y de DTPa-HBV-IPV/Hib se han preparado usando un procedimiento de diálisis con L-cisteína 5,7 mM para eliminar el mercurio residual y conservar la estabilidad del IPV, el procedimiento de diálisis no es adecuado para la producción a gran escala e implica una serie de etapas suplementarias para preparar HBsAg sin tiomersal o mercurio. Por el contrario, el HBsAg de la presente invención preparado sin tiomersal, puede usarse directamente en formulaciones de vacunas combinadas, especialmente en las que contienen IPV.

4. Resumen

El procedimiento usado previamente para la purificación del antígeno superficial derivado de levadura contiene una etapa de exclusión molecular en la que se incluye el compuesto antimicrobiano tiomersal que contiene mercurio en el tampón de elución para controlar la carga biológica.

El tiomersal no se elimina completamente durante las etapas posteriores del procedimiento, de forma que en el antígeno a granel purificado están presentes aproximadamente 1,2 µg de tiomersal por 20 µg de proteína.

Para producir un antígeno a granel completamente exento de tiomersal (mercurio), el procedimiento de purificación se

85
82

ha alterado en dos etapas:

- Se omite el tiomersal del tampón de elución en la etapa de exclusión molecular 4B.
- Se añade cisteína (a una concentración final 2 mM) al eluato reunido procedente de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Esto impide la precipitación del antígeno durante la centrifugación con el gradiente de densidad de CsCl.

No hay más cambios en el procedimiento de producción.

- 10 Se ha caracterizado el antígeno a granel producido por el procedimiento modificado. Los ensayos fisicoquímicos y los análisis demuestran que el antígeno sin tiomersal es indistinguible en sus propiedades del antígeno producido por el procedimiento usado previamente. Las partículas de
- 15 antígeno tienen los mismos constituyentes.

La identidad e integridad del polipéptido HBsAg no se ve afectada por el procedimiento modificado a juzgar por el análisis de SDS-PAGE, la transferencia de Western usando anticuerpos policlonales anti-HBsAg, el análisis de la

20 secuencia N-terminal y la composición de aminoácidos. La microscopía electrónica y el análisis de dispersión de luz láser demuestran que las partículas tienen la forma y el

85
83

tamaño típicos esperados para los HBsAg derivados de levadura. El análisis de transferencia de Western con suero anti-proteína de levadura demuestra que el antígeno producido por el procedimiento sin tiomersal tiene un modelo 5 similar de proteínas de levadura contaminantes. Sin embargo, en los tres lotes de HbsAg producidos usando el procedimiento modificado se reduce en gran medida la cantidad de una banda contaminante que migra a 23K.

Los análisis inmunológicos demuestran que las 10 partículas sin tiomersal tienen una mayor antigenicidad. Las partículas son más reactivas con el equipo AUSZYME de Abbott (que contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales), proporcionando relaciones de ELISA/proteína de 1,6 a 2,25. Este aumento de la antigenicidad también se demuestra con el 15 anticuerpo monoclonal protector RF1. Se requiere una cantidad de antígeno sin tiomersal de 4 a 7 veces menor para inhibir la unión de RF1 a un antígeno fijado convencional. La inhibición de las curvas de unión del antígeno sin tiomersal y del antígeno clásico está dentro de dos familias 20 distintas. Esta diferencia también se muestra por la medición de la constante de afinidad de unión para RF1 usando la resonancia superficial de plasmón. Las afinidades

87
31

de unión de las preparaciones sin tiomersal son de 3 a 4 veces mayores que las del lote de antígeno clásico a granel.

Las preparaciones de antígeno a granel se formularon como vacunas por adsorción en hidróxido de aluminio y sin 5 conservante.

El ensayo de la potencia in vitro usando el equipo AUSZYME ELISA de Abbott y la vacuna monovalente de la hepatitis B de SB Biologicals que contenía tiomersal como patrón, demostró que se obtenían altos valores de potencia 10 in vitro. El contenido de antígeno medido por este ensayo era casi el doble que el valor indicado de 20 µg de proteína por ml.

También se observó un aumento de la reactividad de la vacuna preparada a partir del antígeno sin tiomersal en un 15 ensayo de inhibición con anticuerpos monoclonales RF1 para la unión al antígeno fijado. Se requería aproximadamente la mitad de la cantidad de la vacuna sin tiomersal para proporcionar una inhibición del 50% de la unión de RF1 al antígeno fijado en comparación con el antígeno purificado 20 por el procedimiento usado previamente y formulado sin conservante.

Este aumento de la antigenicidad de la vacuna sin



tiomersal con respecto a RF1 es coherente con los resultados obtenidos a partir del ensayo de potencia in vitro (contenido de antígeno) y con los ensayos del anticuerpo RF1 realizados en las preparaciones de antígeno a granel.

5 Se realizó un ensayo de inmunogenicidad de ratón usando vacunaciones iniciales y de refuerzo separadas por intervalos de dos semanas y con dosis de 2 y 0,4 µg de antígeno. Se extrajo sangre de los ratones en el día 28, 14 días después del refuerzo. Los sueros se analizaron con
10 respecto a la titulación de anticuerpos y composición de isotipos. Se observó un claro efecto de la dosis de antígeno para las dos dosis administradas, pero no hubo una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta en términos de las titulaciones de anticuerpo (GMT) entre las
15 vacunas sin tiomersal y sin conservante.

No se observaron diferencias sustanciales en los perfiles de isotipos.

89
96

Habiendo descrito la invención como antecedente, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

Reivindicaciones

1 Un método para producir una vacuna de hepatitis B, la cual comprende un antígeno superficial de hepatitis B purificado, el antígeno comprende menos de 0.025µg de mercurio por 20µg proteína, donde el antígeno se purifica en presencia de un agente reductor que tiene un grupo -SH libre y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

da por el
de la
de la

2 Un método según la reivindicación 1 donde la vacuna no tiene preservativos.

no se
de la
de la
de la

3 Un método según la reivindicación 2 donde el preservativo es tiomersal.

4 Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde el antígeno de hepatitis es absorbido en hidróxido de aluminio.

5 Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde un antígeno de hepatitis B crudo

- (a) está sujeto a cromatografía de permeación en gel;
- (b) está sujeto a cromatografía de intercambio de iones; y
- (c) se mezcla con un agente reductor que tiene un grupo -SH libre

*Severio
Opiones*

6 Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el agente reductor es cisteína, glutatión, ditiotreitól o β -mercaptoetanol.

7 Un método según la reivindicación 6 donde el agente reductor es cisteína.

8 Un método según la reivindicación 7 donde la cisteína se añade a una concentración final de entre 1-10mM.

9 Un método según la reivindicación 8 donde la cisteína se añade a una concentración final de cerca de 2mM.

91
53

10 Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el antígeno se purifica en presencia de tiomersal antes del tratamiento con el agente reductor.

11 Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 donde el antígeno purificado está completamente libre de tiomersal.

12 Un método según la reivindicación 11 donde la vacuna es una vacuna libre de tiomersal.

13 Una composición de vacuna que comprende un antígeno de hepatitis B purificado, el antígeno comprende menos de 0.025µg de mercurio por 20µg de proteína, donde el antígeno se obtiene por el método de una de las reivindicaciones 1-12.

completo
con
diagnóstico
NOV 03/04

14 Una composición de vacuna según la reivindicación 13 en conjunto con un adyuvante.

15 Una composición de vacuna según la reivindicación 14 donde el adyuvante es una sal de aluminio.

92
89

16 Una composición de vacuna según la reivindicación 15 donde la sal de aluminio es hidróxido de aluminio.

17 Una composición de vacuna según se reivindica en las reivindicaciones 13-16 que comprende un adyuvante inductor TH-1.

18 Una composición de vacuna según la reivindicación 17 donde el adyuvante inductor TH-1 se selecciona del grupo que comprende: 3-DMPL, QS21, 3-DMPL y QS21 y un aliogonucleótido CpG.

19 Una composición de vacuna según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 13-18 la cual comprende adicionalmente uno o más de los antígenos seleccionados del grupo que consiste en: difteria toxoide (D), tétano toxoide (T) antígenos de pertusis acelulares (Pa), virus de polio inactivo (IPC), antígenos de influenza hemofílica (Hib), antígeno de hepatitis A, virus de herpes simple (HSV) clamidia, GSB, HPV, estreptococo de neumonía y antígenos de neiseria.

23

NOV

20 Uso de un antígeno superficial de hepatitis B que comprende menos de 0.025µg de mercurio por 20µg de proteína en la preparación de una vacuna de hepatitis libre de preservativos, el antígeno siendo obtenido por purificación en presencia de un agente reductor que tiene un grupo -SH libre.

21 Un método para producir un antígeno superficial de hepatitis B apropiado para ser usado en una vacuna, el método comprende la purificación del antígeno en presencia de un agente reductor que tiene un grupo -SH libre, donde el antígeno se purifica en presencia de tiomersal antes del tratamiento con un agente reductor.

22 Un método para producir un antígeno de hepatitis B según la reivindicación 21, donde el antígeno purificado comprende menos de 0.025µg de mercurio por 20µg de proteína.

23 Un método para producir un antígeno de hepatitis B según la reivindicación 21 o 22, donde la preparación de un antígeno de hepatitis B crudo:

B
C

remet.

(a) (i)

21+22=1

<

94
91

- (a) está sujeta a cromatografía de permeación en gel;
- (b) está sujeta a cromatografía de intercambio de iones; y
- (c) se mezcla con un agente reductor que tiene un grupo -SH libre

24 Un método para producir un antígeno de hepatitis B según la reivindicación 21-23, donde el agente reductor es cisteína, glutatión, ditiotreitól o β -mercaptoetanol.

25 Un antígeno de hepatitis B inmunogénico, el cual comprende menos de 0.025 μ g de mercurio por 20 μ g de proteína, el antígeno se obtiene por purificación en presencia de un agente reductor que tiene un grupo -SH libre y donde el antígeno se purifica en presencia de tiomersal antes del tratamiento con el agente reductor.

seuvenir

seuvenir
seuvenir

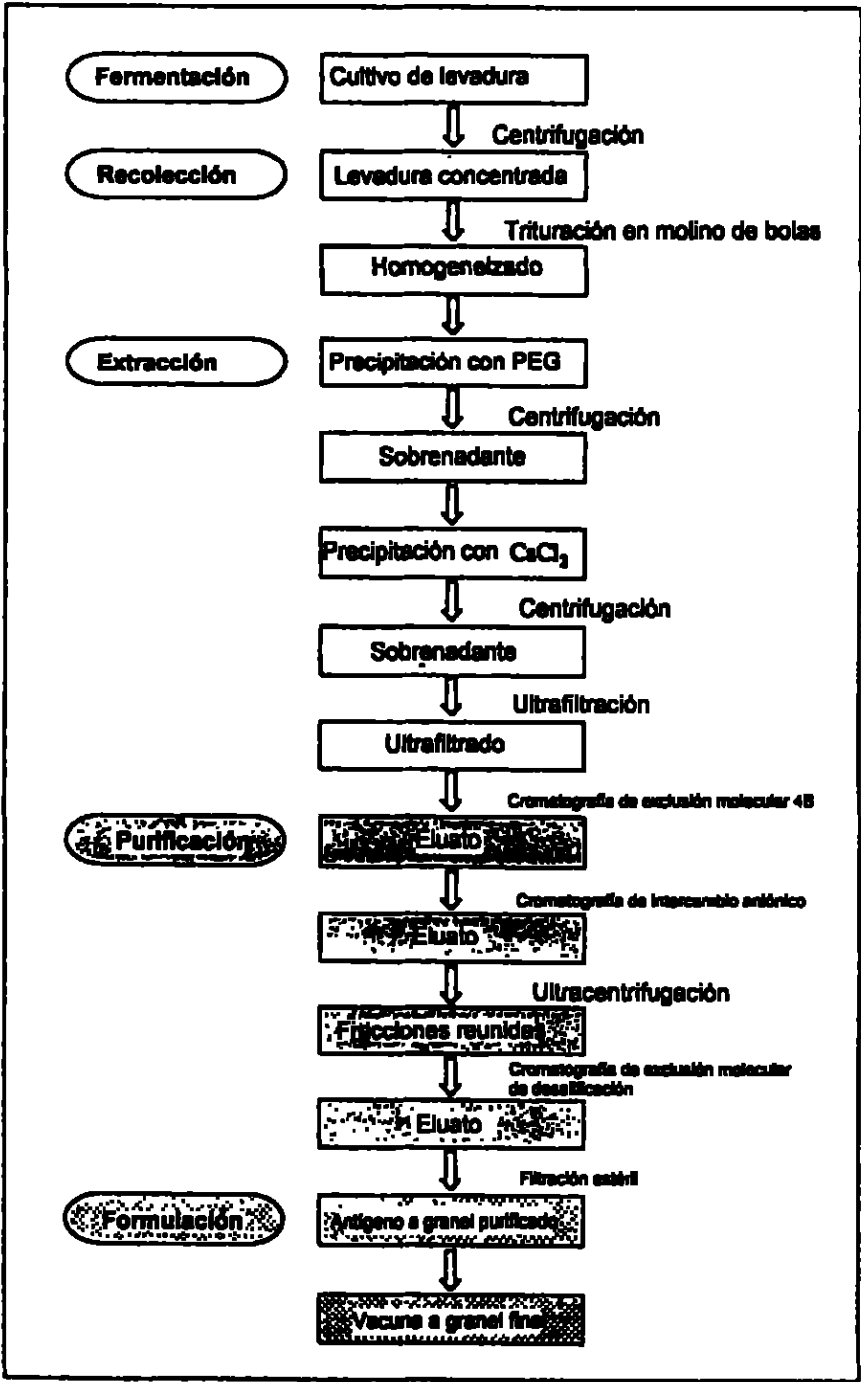
26 Una vacuna que comprende un antígeno de hepatitis B según se reivindica en la reivindicación 25.

da

27 Un método de tratamiento y/o profilaxis del virus infeccioso de hepatitis B, el método comprende la administración a un sujeto humano o animal que sufre de o es susceptible a la infección de hepatitis B de una cantidad segura y efectiva de una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 13-19 y 26.

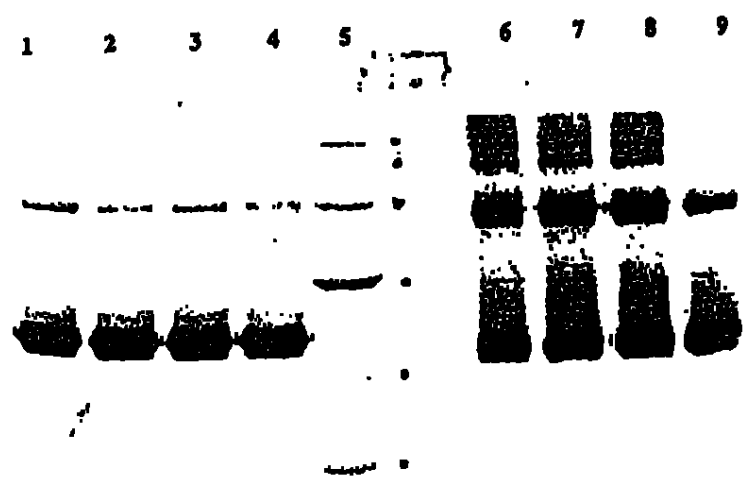
93

Figura 1: Diagrama del procedimiento de producción sin tómersal de Engerix B™



94/93

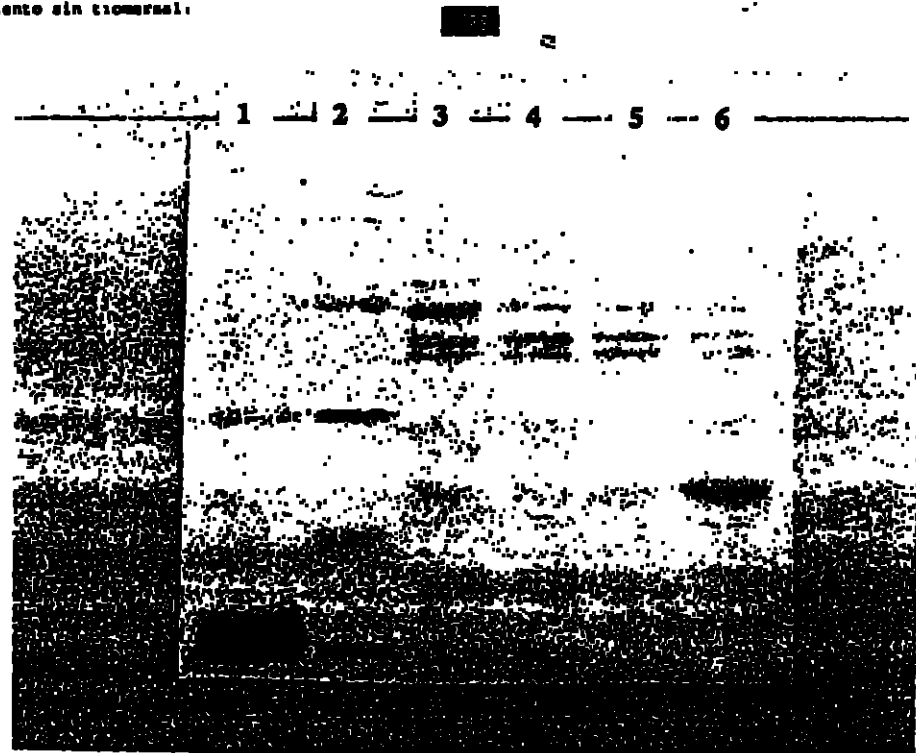
Figura 2: Análisis de SDS-PAGE de lotes de antígeno A granal: tinción con plata: 1 µg de proteína por muestra



- Banda 1: ME7 001, condiciones reductoras
- Banda 2: ME7002, condiciones reductoras
- Banda 3: ME7003, condiciones reductoras
- Banda 4: ME7005, condiciones reductoras
- Banda 5: Marcadores de peso molecular
- Banda 6: ME7001, no reducido
- Banda 7: ME7002, no reducido
- Banda 8: ME7003, no reducido
- Banda 9: ME7005, no reducido

Las posiciones de los marcadores de peso molecular se indican por los puntos negros: 93500, 66200, 45000, 31000, 21500, 14400.

Figura 3: Proteínas de levadura residuales en lotes de antígeno a granel producidos por el procedimiento sin tiomurral.



- Banda 1: Marcadores de peso molecular (precolorados)
- Banda 2: Marcadores de peso molecular bajo (biotinilados)
- Banda 3: HEF001, 20 mcg de proteína
- Banda 4: HEF002, 20 mcg de proteína
- Banda 5: HEF003, 20 mcg de proteína
- Banda 6: HEF005, 20 mcg de proteína

Las posiciones de los marcadores de peso molecular bajo se indican por los puntos negros: 82500, 66200, 48000, 31000, 21500, 14400.

MODELO DE UTILIDAD []

-

INCOMPLETA []

- INCOMPLETA** []

Indragose

- INCOMPLETA** [1

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia