



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21 EXPEDIENTE N°

03-58225

54 TÍTULO METODO DE FABRICACION DE VACUNA
COMBINADA

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL IPC7 A61K 39/29

71 SOLICITANTE L6 LIFE SCIENCES, LTD.

DOMICILIO 20, Yonido-dong, Yongsdeungpo-kn, 150-721 Seoul,
República de Korea

74 APODERADO Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22 BOGOTÁ, D. C. 10 JUL. 2003

202099

202008



03 058225 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 03058225 00000000

Folios: 01

Fecha (AMB): 2003-07-10 14:26:31

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I☒ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: LG LIFE SCIENCES, LTD.

Dirección: 20, Yeoldo-dong, Youngdeungpo-ku, 150-721 Seoul, REPUBLICA DE KOREA
Nacionalidad o Domicilio: Seoul, KOREA
Lugar de Constitución: KOREA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CARRERA 9 No. 93-09

Teléfono: 610 74 80 Fax: 610 07 06

E-mail: acastell@impsat.net.co

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐Número 38779.854 TPA 70.819

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: KYU-WAN KIM; HYI-JEONG JI; YOUN-KYEONG LEE; WAN-KYU KIM; HEE-KU LEE; WON-KYUM KIM

Dirección: (VER ANEXO No. 1)

Nacionalidad o Domicilio

Daejeon, REPUBLICA DE KOREA

⑤

PCT (88)

Solicitud Internacional No.

PCT/KR02/00034

Fecha

9/1/02

Publicación Internacional No.

WO 02/055105 A1

Fecha

18/07/2002

⑥

Título (54)

METODO DE FABRICACION DE VACUNA COMBINADA

⑦

Clasificación Internacional (51) IPC7 A61K 39/29

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

KR10-01-012001-0001290SI ☒NO ☐

⑨

Comprobante de pago No.

03-47.344

Fecha

Julio 8, 2003

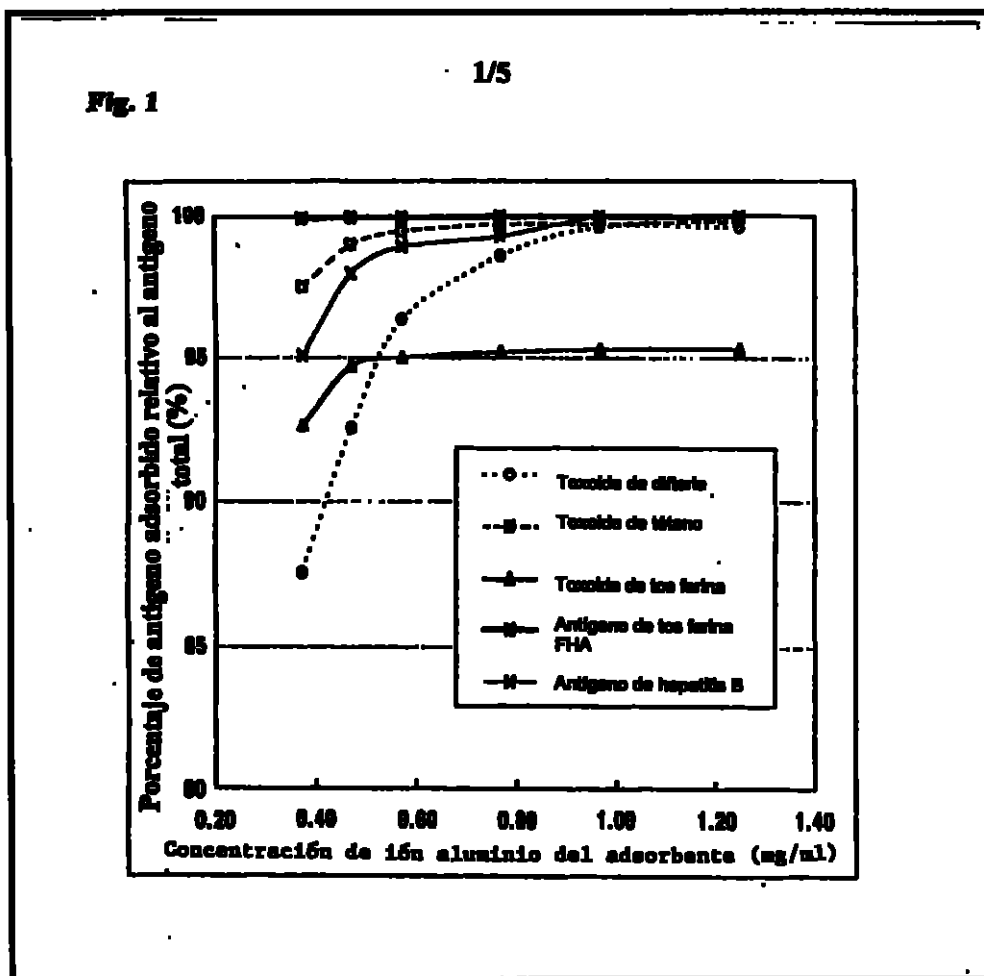
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

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.
- ☐ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo hecha a mi favor
- ☐ 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.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ 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, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: copia de la notificación del registro de cambio de nombre junto con su traducción simple.

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA: *Margarita Castellanos*
C.C. N° 39.779.664 Ucaquén - TPA 70.819 C.S.J.

10 JUL. 2003

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
A B O G A D O S
Carrera 9 No. 93-09
Apartado 8348
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

3 B

ANEXO No. 1

INVENTORES

NOMBRE

DOMICILIO

1. Kyu-wan, KIM

8-110, LG Dormitory, Doryong-Dong, Yuseong-Gu, 305-340 Daejeon, REPUBLICA DE KOREA

2. Hyl-Jeong, JI

6-302, LG Dormitory, Doryong-Dong, Yuseong-Gu, 305-340 Daejeon, REPUBLICA DE KOREA

3. Youn-kyeong, LEE

202-1705, Saemmeori Apt., Dunsan 2-Dong, Seo-Gu, 302-777 Daejeon, REPUBLICA DE KOREA

4. Wan-kyu, KIM

106-401, Chung-gu Apt., Jeonmin-Dong, Yuseong-Gu, 305-729 Daejeon, REPUBLICA DE KOREA

5. Hee-ku, LEE

305-403, Songganggreen Apt., Songgang-Dong, Yuseong-Gu, 305-751 Daejeon, REPUBLICA DE KOREA

6. Won-kyum, KIM

109-709, Nokwon Apt., Dunsan 2-Dong, Seo-Gu, 302-732 Daejeon, REPUBLICA DE KOREA

A
u

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 83058225 00000000 Folios: 81
Fecha (AMD): 2003-07-10 14:26:31
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE MPCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 47,344
FECHA : JULIO 8 DE 2003

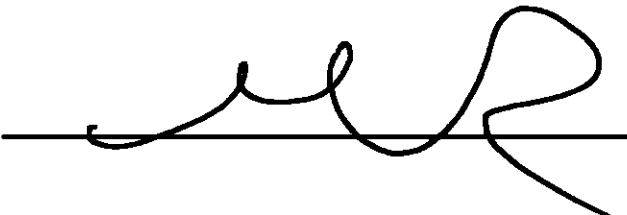
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
RONICA VALENCIA ABONDANO	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	4693740	08/07/2003	1,392,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-01	SOLICITUDES	
		110 PTC SOLICITUD DE PATENTE DE INVEN	400,000.00
		TOTAL :	\$ 400,000.

SOM: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

MANUFACTURING METHOD OF COMBINED VACCINE

BACKGROUND OF THE INVENTION

TECHNICAL FIELD

5 The present invention relates to manufacturing method of combined vaccine capable of preventing concurrently various diseases of infants such as diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B, and other diseases, which should be prevented in infants.

BACKGROUND ART

10 A combined vaccine is directed to a vaccine manufactured by combining protective antigens for each disease with respect to various other infection diseases or a vaccine manufactured by combining of various related antigens to prevent one infection disease.

15 As examples of the former, there are a DTP vaccine capable of enhancing an immunity with respect to diphtheria, tetanus and pertussis, a MMR vaccine capable of enhancing an immunity with respect to measles, mumps, and german measles, and so on. The above vaccines have been used for 20 years. As examples of the latter, there are a pneumococcal vaccine
20 manufactured by combining 14 or 23 pneumococcal polysaccharides capable of enhancing an immunity to pneumonia, and a meningococcus vaccine manufactured by combining 4 meningococcal polysaccharides capable of enhancing an immunity to protect meningitis and so on. The above vaccines have been used for a few years.

25 The above vaccines have been used for many years since its development are well recognized with their high immunogenic effects and less side effect with respect to each infection disease and with their good adaptation to protect various diseases. Vaccine developers are newly developing various types of combined vaccines for the above reasons. As the
30 above combined vaccines, there is a vaccine (International Publication No. WO

99/13906) manufactured by combining a DTP vaccine, bacterial encephalomeningitis vaccine (Hib vaccine), inactivated polio vaccine, and hepatitis B vaccine. A certain combined vaccine is developed by the combination of pneumococcal and meningococcal polysaccharides conjugated with protein. A combined vaccine capable of preventing from an intestinal infection with respect to each causing bacteria of cholera, typhoid, dysentery, and diarrhea will be developed soon.

The combined vaccine prepared in the way of combining each antigen for preventing various other infective diseases has advantages in that the number of vaccinations decreases, and the supply of vaccines is simple for thereby decreasing the cost. According to the Infant vaccination schedule recommended by Pediatrics Association (1997), the infants gets many times of shot within 1 years after birth, and injection of vaccine is sometimes overlapped with different vaccines due to convenience or illness. Therefore, it is important to inoculate the infants based on a proper method for thereby providing a certain convenience to both vaccinating persons and inoculated persons. In particular, as the standardized vaccination schedule, the DTP and the hepatitis B vaccinations are guided to perform three times of primary shots within the first year of infants and boost shots. In addition, since the vaccination schedules recommended are similar, the problem of overlapping shots can happen.

The inventors of the present invention performed a research for providing a certain convenience for vaccination to both the vaccinating persons and the inoculated persons by developing the combined vaccine of DTP and hepatitis B vaccines and stabilizing of the supply of the vaccine for thereby providing a vaccination benefit to more people.

Since the research on the combined vaccine is mostly directed to combining each component antigen from the vaccine products which is provided in the immunity and stability, the development of the combining method is important to minimize a variation in the reaction and immunity

A
X

occurring due to an interaction between each protective antigen and adsorbent is important for the above research. With the completion of development, the homogeneity and stability of the combined vaccine formulations invented have been reviewed. In the present invention, the research has been performed
5 based on the DTP vaccine and hepatitis B vaccine which are proved for their immunity and stability.

As a method for combining each component vaccine, there are a method (International Publication Nos. WO 99/13906 and WO 00/7623) of simply combining the products of each component vaccine, a method
10 (International Publication No. WO 99/13906) of administering simultaneously when the vaccination is performed, using the specially designed container, and a method of manufacturing the combined vaccine by mixing each component of vaccine and ingredients in one formulation. Concerning the vaccine supply, the usage of the combined vaccine prepared by the former two methods are
15 similar to the use of each monovalent vaccine singularly it needs more attention to handle vaccines than each monovalent vaccine, so that there is not an advantage in using this type of the combined vaccine. In addition, it is impossible to perform a research with respect to the variation of the immunity and the occurring of the side effects. Therefore, it is preferable that each
20 vaccine component is mixed in one formulation as one product on the research of the combined vaccine.

The purpose of the present invention is to provide a manufacturing method of combined vaccine capable of preventing various diseases of infants including diphtheria, tetanus, pertussis and hepatitis B, which should be
25 prevent in infants.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

Accordingly, it is an object of the present invention to provide manufacturing method of combined vaccine for concurrently preventing various
30 diseases of infants such as diphtheria, tetanus, pertussis and hepatitis B, which

should be prevented in infants.

In order to achieve the above object, there is provided a manufacturing method of a combined vaccine, comprising the steps of:

The adsorption step of independently adsorbing each protective antigen
5 to adsorbent respectively with respect to various diseases; and

The combination step of mixing each above protective antigen adsorbed to the adsorbent.

And there is also provided the method wherein the protective antigen is the antigen selected from the group comprising diphtheria antigen, tetanus
10 antigen, pertussis antigen, hepatitis B antigen, or two or more combination thereof.

And there is also provided the method, wherein the adsorbent is aluminum hydroxide gel.

And, in order to achieve the above object, there is provided a combined
15 vaccine as produced according to any of the above methods.

More specifically, the present invention provides the manufacturing method of a combined vaccine which includes the steps of independently adsorbing each protective antigen to an adsorbent of an aluminum hydroxide gel with respect to various diseases such as diphtheria, tetanus, pertussis, and
20 hepatitis B which should be prevented in the infants, and combining each protective antigen adsorbed to the adsorbent after the adsorption.

The antigens of the present invention is not limited by the mentioned diseases but applied to various antigens from various diseases.

25 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The present invention will become better understood with reference to the accompanying drawings which are given only by way of illustration and thus does not limit to the present invention, wherein;

Fig. 1 is a view illustrating an adsorption ratio of each component
30 antigen based on concentration of an adsorbent. Diphtheria toxoid, tetanus

toxoid, and hepatitis B virus surface antigen are a components of diphtheria antigen, tetanus antigen and hepatitis B antigen, and pertussis toxoid and pertussis FHA antigen(pertussis thready shape blood agglutinin corpuscle) are each component of a purified pertussis antigen;

5 Figs. 2a to 2d are views illustrating an antigenicity and immunity based on an adsorption method wherein sample 1 is a sample in which surplus aluminum hydroxide gel is added after a combination of each component vaccine is completed, and sample 2 is a sample in which the said adsorbent of the same concentration is previously added before the combination is
10 completed; Figs 2a and 2b are views illustrating the relative antigenicity of samples 1 and 2 respectively and, Figs 2c and 2d are views illustrating the relative level of antibody formation against each antigen of samples 1 and 2, respectively.

Fig. 3 is a view illustrating the level of antibody formation against each
15 antigen in the serum obtained from monkeys administered a combined vaccine prepared according to the present invention or concurrently each vaccine product of DTP and hepatitis B based on the date of collecting blood samples from each monkey. Group 1 is designated that each vaccine of DTP and hepatitis B are concurrently administered, and group 2 is designated that a
20 combined vaccine is administered.

MODES FOR CARRYING OUT THE PREFERRED EMBODIMENTS

As the method for manufacturing the combined vaccine containing each vaccine component as one product, the above method is divided into two
25 steps: a method for the step of combining the antigens which form each component vaccine and performing an adsorption using an adsorbent and a method for the step of combining the previously adsorbed antigens, in the case that an adsorbent is used as a component in the said method. However, in the case that each component antigen are first mixed, an adsorption ability with
30 respect to the adsorbent of each antigen may decrease due to the interaction

10-10

among antigens and ingredients in solution. In addition, the adsorption between the adsorbent and component antigen is optimized under each independent condition. If the above adsorption processes are concurrently performed, the adsorption ratio may be decreased due to a difference in the adsorption condition of each component antigen. Since the interrelationship between the adsorption ratio with respect to the adsorbent of the component antigen and the immunity of the vaccine is in inverse proportion, the immunity of the combined vaccine, which is manufactured in the process performed concurrently, may be decreased compared to the immunity of each monovalent vaccine.

Therefore, the inventors of the present invention have judged that it is proper to manufacture a combined vaccine by preparing a bulk solution of each component antigen, independently performing an adsorption of each antigen and combining the adsorbed antigens together.

In addition, in the case that each component antigen is combined in each adsorption type, the final concentration of each component antigen in the combined vaccine should be the same as the concentration of the component antigen in each conventional monovalent vaccine, to compare the immunity and the characteristics of vaccine antigens in vaccine products. Therefore, to manufacture the combined vaccine, the component antigen more concentrated than a single vaccine is adsorbed and then combined. The DTP vaccine is manufactured based on an adsorption using the antigen which is concentrated 1.5~2 times, and the hepatitis B vaccine is manufactured using the antigen which is concentrated 2~3 times. The final concentration of each component antigen of the combined vaccine according to the present invention is coincided with the concentration of each single vaccine adjusting the combining ratio of each antigen.

According to the present invention, the inventors performed the various studies of combinations for developing the combined vaccine. In this case, the final content of each immune component in a vaccine product is the same as

the content of the monovalent vaccine. In addition, the change of the adsorption ratio of each antigen is monitored by controlling the contents of the adsorbent and other components. Each sample which has a less change in the adsorption ratio is immunized into small animals to compare the level of the antibody formation. A proper combining method was selected by reviewing the result of antibody formation in small animals.

In addition, as a result of the review with respect to the adsorbents of the currently commercial DTP vaccine and the hepatitis B vaccine, aluminum hydroxide gel and aluminum phosphate gel were mainly used. It is known that the adsorption of the protein to each aluminum gel is caused by a surface electric charge of each protein and a gel component. And it is also known that the aluminum hydroxide gel has a positive surface electric charge in a physiological pH range, and aluminum phosphate gel has a negative surface electric charge ("Vaccine Design - The subunit and adjuvant approach", ed. By M.F. Powell & M.J. Newman, 1995, p229-239). In the case that the above two types of aluminum gels are concurrently used, a certain interaction occurs, so that the size of particle in the solution may be increased, and the adsorption capacity to protein may be decreased. In addition, the surface electric charge of each component antigen of the hepatitis B vaccine and combined vaccine has generally a negative surface electric charge in a physiological pH range. Therefore, the aluminum hydroxide gel is proper as an adsorbent.

In the conventional art, the component of the adsorbent such as the aluminum hydroxide gel and aluminum phosphate gel was co-used (International Publication No. WO 93/24148) but based on the above reason, the inventors of the present invention judged that the adsorbent of the combined vaccine should have the same salt type and the aluminum hydroxide gel which is used as an adsorbent is an important factor for obtaining a certain adsorption ratio of each component antigen.

But it is evident that the adsorbent covers not only the aluminum hydroxide gel but also its equivalents in the present invention.

12
12

In addition, in the combined vaccine prepared by the present invention, other component antigens except hepatitis B antigen include proteins as a main component, while, in the case of the hepatitis B vaccine, the antigen exists generally in a particle type which includes a phospholipid layer.

5 Therefore, it is preferred that when manufacturing the hepatitis B vaccine for a combined vaccine prepared by the present invention, in order to decrease a certain interference by other antigens with respect to the phospholipid component of the hepatitis B vaccine antigen which includes a phospholipid layer, a neutral surfactant such as Polysorbate 20 (Tween 20), Polysorbate 80
10 (Tween 80) and Triton X-100 are added.

Since the titer of the hepatitis B vaccine tends to decrease in the case that the amount of the neutral surfactant is high, it is preferred that the neutral surfactant is added at the mass ratio below 50% with respect to protein amount of the hepatitis B surface antigen but the above amount is not limited thereto.

15 In the present invention, *Corynebacterium diphtheria*, PW No. 8 as an antigen of the diphtheria is prepared and cultivated in a proper culture medium. The diphtheria toxoid is preferred, which is obtained by detoxifying the diphtheria toxin which is purified by a conventional method. The amount of the antigen is preferably 10~25 Lf based on the pediatric dose. As a tetanus
20 antigen, *Clostridium tetani*, Harvard, is cultivated in a proper culture medium under anaerobic condition. The tetanus toxoid which is obtained by detoxifying the tetanus toxin purified by the conventional method is proper. The amount of the antigen is preferably 1~5Lf based on the pediatric dose. In addition, the Pertussis antigen is cultivated in a proper culture medium using *Bordetella pertussis*, Tohame phase 1, and multiple kinds of antigen protein including a
25 Pertussis toxoid are purified by a conventional method in a culture supernatant and detoxified. Purified Pertussis antigens or a whole cell Pertussis antigen is proper. Here, the manufacturing method of a combined vaccine is provided in which in the case of the multiple kinds of antigens, the total amount of the
30 antigens is below 20µgPN based on the pediatric dose, and in the case of the

whole cell Pertussis antigen, the amount of the antigen is preferably below 20
OE based on the pediatric dose. The present invention is further directed to a
method for manufacturing a combined vaccine in which purified multiple
antigen proteins include a detoxified Pertussis toxoid and filamentous
5 hemagglutinin (FHA) antigen.

Preferably, the present invention is directed to a method for
manufacturing a combined vaccine in such a manner that the amount of
recombinant hepatitis B virus surface antigen, which manufactured by a
genetic engineering method as a hepatitis B antigen, is 5~10ug based on the
10 pediatric dose. More preferably, the present invention is directed to a method
for manufacturing in such a manner that the hepatitis B surface antigen is
adsorbed to an adsorbent by mixing with stirring at 2~8°C for 3~20 hours. In
order to find the optimum content of adsorbent for manufacturing of the
combined vaccine, the adsorption ratio for each antigen component was
15 analyzed at each concentration of adsorbent. As a result, when the final
aluminum ion concentration is below 0.5mg/ml at the time when the final
combination is completed, the adsorption ratio of each antigen was relatively
decreased (as shown in Fig. 1). In addition, the aluminum ion concentration is
stipulated to be under 1.25mg/ml in the aluminum gel used for the vaccine by
20 regulation (WHO, "Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and
combined vaccines" in Technical Report Series No. 800, 1990, p87~179).
Therefore, as the aluminum hydroxide gel, the concentration of the final
aluminum ion is preferably in the range of 0.5~1.25mg/ml and more preferably
in the range of 0.7mg/ml.

25 In addition, in order to prevent a possibility that the absorption ratio of
each component antigen is decreased by a repulsive force caused among
each component antigen, even after the combination of each component is
completed, the antigenicity and the level of antibody formation of each
component antigen are converted to the relative percentage to compare those
30 values between two samples: a sample that the other component except an

aluminum hydroxide gel is previously combined and then surplus aluminum hydroxide gel is additionally added and a sample that the adsorbent of the same concentration is previously added before the combination is completed. The change of the antigenicity and the level of antibody formation decreases
5 when the surplus adsorbent is added even after the combination of each component is completed (as shown in Fig. 2).

In addition, in the case of the sample in which the polysorbate 20 80 (tween 80) is added, the antigenicity and titer with respect to the hepatitis B were maintained (as shown in Fig. 2). It is expected that a similar result is
10 may be obtained even when neutral surfactants such as polysorbate 20 and triton X-100 are used within proper concentration. As shown in Fig. 2, the sample 1 and sample 2 are prepared in the way of that surplus aluminum hydroxide gel is additionally added after the combination of each component is completed, and that the adsorbent of the same concentration is previously
15 added before the combination is completed, respectively.

Preferably, the present invention is directed to a method for manufacturing a combined vaccine in which the aluminum ion concentration of the aluminum hydroxide gel is in the range of 0.5~1.25mg/ml. More preferably, the present invention is directed to a method for manufacturing a combined
20 vaccine which includes a step of adding surplus adsorbent in the range that does not exceed the concentration range of the aluminum ion of 0.5~1.25 mg/ml after protective antigens adsorbed to the adsorbent are combined. In a preferred embodiment of the present invention, it is possible to maintain an inherent adsorption of each component antigen in the combined vaccine and to
25 increase an immunity.

As the Pertussis antigen, a purified Pertussis antigen is generally used in Korea and several other countries. Since some American countries and the third world countries use the-a whole cell Pertussis antigen which is detoxified. Therefore, in the present invention, the applicable range of the combined
30 vaccine is widened by the study on the combining method using whole cell

pertussis antigen. In this case, the combining was performed in the same method as using the mentioned purified Pertussis antigen for thereby obtaining a sample capable of maintaining an immunity of each component(as shown in Table 1).

5 In the case of the DTP vaccine which includes a whole cell Pertussis antigen, a aluminum phosphate gel is generally used as an adsorbent. However, In order to manufacture a combined vaccine with respect to the hepatitis B antigen, the DTP vaccine was manufactured using the aluminum hydroxide gel. In this case, the immunity with respect to the Pertussis was
10 decreased, but when a surplus aluminum hydroxide gel was additionally added after the combination of each component vaccine was completed (sample A), it was possible to maintain a desired immunity. As a reference, the sample B is prepared in the way of that the adsorbent of the same concentration was previously added before the combination was completed.

15 The safety and efficacy of the combined vaccine manufactured according to the present invention was proved based on the following methods. First, overdosage of combined vaccine was administrated to a rodent, and it was checked that a lesion was not observed as a result of the biopsy (The result of the same is not provided). In addition, the antibody level against each
20 antigen was measured in a group (group 2) in which a combined vaccine was administrated to a monkey and in a group (group 1) in which each vaccine of DTP and hepatitis B was concurrently administrated. As a result of the t-test with respect to the antibody amount between two groups, when comparing the result of the group 2 with the result of the group 1, it was evaluated that the
25 combined vaccine showed the equal or better immunogenicity against each antigen to concurrently Injection group of each vaccine (as shown in Fig. 3. The result of the statistic is not provided).

In conclusion, the combining method was developed in the present invention, which an interaction among different immune components was
30 minimized, and each immunogenic effect did not decrease. When dividing each

immune component used for the combined vaccine based on physical and chemical properties, the immunogenic components may be divided into a protein antigen (diphtheria antigen, tetanus antigen, purified Pertussis antigen), an antigen composed of protein and phospholipid layer (hepatitis B antigen),
5 and an antigen composed of killed whole cell (a whole cell Pertussis antigen), etc. Therefore, it may be predicted that a combination with other antigen of single vaccine may be implemented based on the physical and chemical characteristics of components. A combination of an additional vaccine may be possible with respect to the diseases (hemophilus influenza, polio), which
10 should be prevented in the infants by the combined vaccines prepared according to the present invention.

The body vaccination period of the combined vaccine agent according to the present invention may be the previous vaccination periods of the DTP vaccine or the hepatitis B vaccine. In the case that there is the hepatitis B
15 antigen in the mother's body, it is preferred to inoculate three times of second, fourth and sixth months. In the case that there is not the hepatitis B in the mother's body, as a proper vaccination period, the hepatitis B vaccine is singularly inoculated after birth, and then the additional vaccination is performed using a combined vaccine. A proper vaccination with respect to the
20 infants can be performed by a muscle or hypodermic injection method. The dose of the antigen of diphtheria, tetanus, Pertussis and hepatitis B respectively in the combined vaccine according to the present invention is the same as the dose for the infant of the antigen of each single vaccine.

25 Example 1

Manufacture of hepatitis B antigen

The yeast cell which is capable of expressing the hepatitis B surface antigen by genetic engineering method is intensively cultivated. 1kg of the precipitate of yeast cells which is obtained by the centrifugation is diluted at a
30 ratio of 1:2 in a buffer solution (0.5M NaCl, 10mM EDTA, 0.01% Thimerosal,

17

0.1M Phosphate, pH 7.0). The diluted solution flows through a glass bead beator (or Dynomil) for thereby breaking cell walls and so on. The obtained solution is added with a neutral surfactant (Tween group or Triton group) by 0.5% and is uniformly mixed by stirring at 4°C. Sodium hydroxide was added to the resultant solution for thereby obtaining pH 11 and is then mixed by stirring at 4°C for 5 hours. A diluted hydrochloric acid was added to the resultant solution for thereby obtaining pH 4. The precipitate was removed by a centrifugation at 6000rpm for 15 minutes using the centrifugal machine (ROTOR: JA-14, Beckman Inc. USA), and the upper solution including the hepatitis B surface antigen was obtained. The pH of the upper solution was made at 7, and then silica was added thereto and was mixed at 4~25°C for 3~18 hours, so that the hepatitis B surface antigen was adsorbed to the silica. The silica gel which is preferably used in the present invention is Aerosil 380(Degussa, USA) which includes fine hydration silica or anhydrous silica having a valid surface area of 100~500mm²/g. In order to remove contaminants from the silica to which the hepatitis B surface antigen is adsorbed, the resultant solution was washed two times using sodium phosphate – sodium chloride buffer solution of pH 7. The washed silica was contacted in the sodium carbonate buffer solution of pH 9.6 for about 2 hours for thereby desorption of a surface antigen. The thus separated surface antigen had a protein purity of above 90% in the solution. The resultant solution was flown in the DEAE-Sepharose (PHARMACIA, Sweden) which was balanced using the said sodium buffer solution for thereby specifically attaching a surface antigen and removing the substances separated in the column using the said buffer solution. Contaminants slightly attached on the column was eluted using the buffer solution including sodium chloride of 0.05~0.1M. Thereafter, the hepatitis B surface antigen was eluted using the said buffer solution including the sodium chloride of 0.2M. The thus eluted solution was concentrated using a ultrafiltration membrane which is capable of separating the substance of molecular weight above than 100,000, and the precipitate was separated by

18
14

14

centrifugation and removed, and the upper solution was collected, and the gel permeation chromatography (Sephacrose CL-4B, PHARMACIA, Sweden) was performed with respect to the collected upper solution. The fractions which included a pure surface antigen were confirmed by electrophoresis and were used as the hepatitis B antigen. In addition, in order to decrease an interaction with each of the hepatitis surface antigen, the tween 80 was added to 0, 5, 10 μ g per 1ml, and then the effect of tween 80 was observed (as shown in Fig. 2).

10 Example 2

Manufacture of diphtheria toxoid

The corynebacterium diphtheria PW No. 8 was cultured at 35°C for 24 hours in the nutrition agar culture medium (DIFCO, USA) and was subcultured two times. One of the colony was cultured at 35°C for 24 hours in 2ml of the brain heart infusion culture medium (DIFCO, USA), and 1.2ml of it was inoculated to the modified Muller culture medium (refer to: Stainer, et. al, Canadian J. Microbiol., 14:155, 1968) of 300ml and was cultured at 35°C for 36 hours. After the culture, cells were removed from the culturing solution, and the toxin solution was collected and it was added with ammonium sulfate at 4°C.

20 The final concentration was made in 25(w/v)%, and pH was made in 8.0. The culturing solution having adjusted pH and concentration of salt was dropped into the phenyl-sepharose column which was previously balanced using 10mM tris buffer solution pH 8.0 including 25(w/v)% ammonium sulfate. The buffer solution same as the column balance solution and 10mM tris buffer solution(pH 8.0) including 15(w/v)% ammonium sulfate were sequentially flown to the column for thereby removing impurities. The toxin was eluted using 10mM tris buffer solution(pH 8.0) which did not include salt. The eluted diphtheria toxin solution was collected and was dialyzed to 10mM phosphate buffer solution(pH 7.4) including sodium chloride of 150mM. After the dialyzing process was completed, formalin was added, so that the final concentration was 0.05(w/v)%,

19

15

and the resultant solution was reacted at 37°C for 1 hour, and lysine was added for thereby obtaining the final concentration of 0.05M and then, the resultant solution was detoxified at 37°C for 4 weeks. The toxoid solution was dialyzed into 10mM phosphate buffer solution(pH 7.4) with sodium chloride for thereby fully removing the formalin, and thimerosal was added to have 0.01(w/v)% of the final concentration. The resultant solution was used as diphtheria toxoid solution.

Example 3

10 Manufacture of tetanus toxoid

The *Clostridium tetanii* (Harvard strain) was cultured by molten agar method with sterilized liver-bile agar medium (DIFCO, USA). A few colonies from above culture were inoculated into brain heart infusion culture medium (DIFCO, USA) including 0.3(w/v)% yeast extraction (DIFCO, USA) of 2ml
15 having decreased oxygen level and were cultured at 35°C for 24 hours in anaerobic state. And then, the culture solution was inoculated into fully nitrogen-saturated brain heart infusion culture medium (DIFCO, USA) 500ml including 0.3(w/v)% yeast extraction (DIFCO, USA) and were cultured at 35°C for 7 days in anaerobic state. After the culture, cells were removed from the
20 culture solution, the toxin solution was collected and added with ammonium sulfate at 4°C for thereby obtaining the final concentration of 60(w/v)% and was mixed for over 24 hours and was fully mixed for thereby obtaining a precipitate by centrifugation. The precipitate was dissolved in a small amount of distilled water, and the insoluble material was removed. The resultant solution was
25 dropped into the sephagril S-100 column which was previously balanced using 10mM tris buffer solution(pH 8.0) including 0.5M sodium chloride. The same buffer solution was flown for thereby eluting the separated toxin. The tetanus toxin solution was collected and dialyzed into 10mM phosphate buffer solution(pH 7.4) including 150mM sodium chloride. After the dialysis, formalin
30 was added to have the final concentration of 0.025(w/v)% and was reacted at

37°C for 1 hour. Thereafter, lysine and sodium hydrogencarbonate were added to have the final concentration of 0.05mM and 0.04M, respectively, and was matured at 37°C for 4 weeks and was detoxified. After the detoxification, the toxoid solution was dialyzed into 10mM phosphate buffer solution (pH 7.4) including 150mM sodium chloride, and formalin was fully removed. Thimerosal was added to have the final concentration of 0.01(w/v)% and was used as tetanus toxoid solution.

Example 4

10 Manufacture of purified Pertussis antigen protein

Bordetella pertussis, Tohama phase I was cultured in Bodet-Gengo agar culture medium(DIFCO, USA) including 15% rabbit blood at 35°C for 72 hours and was passaged two times. A few colonies were inoculated into 50ml of stanor-sholte culture medium and was cultured at 35°C for 48 hours. The thusly cultured solution were re-inoculated in 500ml of changed stanor-sholte culture medium(refer to Imazumi et al., INFECT.-IMMUN., 1983, vol 41, pp. 1138) and was cultured at 35°C for 36 hours. 10% thimerosal aqueous solution was added to the cultured solution to have the final concentration of 0.01% for thereby preventing the growth of the Pertussis bacteria, and then the cells were removed by centrifugation. Three times volume of distilled water was added to the resultant solution, and was mixed well. The current pH was decreased to pH 6.0 using 1N sulfuric acid. The resultant solution was dropped into CM-sepharose column which was previously balanced using 10mM sodium phosphate buffer of pH 6.0. The buffer solution same as the column balance solution was flown to the column for thereby removing the substances which were not coupled to the column, and the impurities which were slightly coupled to the column were removed using the buffer solution same as the column balance solution including 100mM sodium chloride. When the Impurities were not eluted anymore through the column, the bound materials were eluted with linear gradient formed by the column balance solution including 100mM sodium

chloride and 600mM sodium chloride which have the same volume, so that a fraction including Pertussis antigen protein such as Pertussis toxin and FHA (filamentous hemagglutinin) was separated. The antigen fraction was diluted using 10mM sodium phosphate buffer solution(pH 8.0) of two times volume to have pH 8.0. The resultant solution was dropped into hydroxy apatite column which was previously balanced using 10mM sodium phosphate buffer solution of pH 8.0. The buffer solution same as the column balance solution including 100mM sodium chloride was flown to the column for thereby removing the substances which were not coupled to the column. 80mM sodium phosphate buffer solution of pH 8.0 including 100mM sodium chloride was flown at the same rate as the dropping rate for thereby separating Pertussis toxin fraction. When the Pertussis toxin was separated, 250mM sodium phosphate buffer solution of pH 8.0 including 100mM sodium chloride was flown at the same rate as the dropping rate for thereby separating FHA(filamentous hemagglutinin) fraction. Separated Pertussis toxin and FHA(filamentous hemagglutinin) were dialyzed in 10mM sodium phosphate buffer solution(pH 7.4) including 0.15% sodium chloride at 4°C. Glycerol and glutal aldehyde were added to dialyzed Pertussis toxin sample solution to have the final concentration of 50(w/v)% and 0.05(w/v)% and were detoxified at 37°C for 4 hours. Sodium aspartate was added to have the final concentration of 0.025M for thereby completing the detoxifying process. Glycerol and formalin were added into the dialyzed FHA (filamentous hemagglutinin) sample solution to have 50(w/v)% and 0.025(w/v)% and were detoxified at 37°C for 24 hours. Lysine was added to have the final concentration of 0.025M, so that the detoxifying process was completed. Each sample solution was dialyzed into 10mM sodium phosphate buffer solution (pH 7.4) including 0.15% sodium chloride at room temperature. Thimerosal was added to have the final concentration of 0.01(w/v)%. Thereafter, detoxified Pertussis toxin sample solution and FHA (filamentous hemagglutinin) sample solution were mixed at a ratio of 1:4 and were used as a Pertussis antigen protein.

22
22**Example 5****Manufacture of a whole cell Pertussis antigen**

Pertussis bacteria, *Bordetella pertussis*, Tohama phase I was cultured in
5 Bodet-Gengo agar culture medium(DIFCO, USA) including 15% rabbit blood at
35°C for 72 hours and was passaged two times. Some of the colonies were
inoculated into 50ml of Stanor-sholte culture medium and were cultured at
35°C for 48 hours. The resultant solution was re-inoculated in the changed
stanor-sholte culture medium(refer to Imazumi et al., INFECT.-IMMUN., 1983,
10 vol 41, pp. 1138) of 500ml and were cultured at 35°C for 36 hours. 10%
thimerosal aqueous solution was added into the culture solution to have the
final concentration of 0.01% for thereby preventing the growth of the Pertussis
bacteria and collecting somatic based on the centrifugation. The collected
somatic solution was dialyzed in 10mM sodium phosphate buffer solution(pH
15 7.4) including 0.15% sodium chloride at 4°C. Formalin was added into the
dialyzed Pertussis somatic solution to have the final concentration of
0.025(w/v)% and was detoxified at 37°C for 4 weeks. Lysine was added to
have the final concentration of 0.025M for thereby completing the detoxifying
process. The sample solution was dialyzed into 10mM sodium phosphate
20 buffer solution(pH 7.4) including sodium chloride of 0.15%, and thimerosal was
added to have the final concentration of 0.01(w/v)% and was used as the
whole cell Pertussis antigen.

Example 6

25 **Manufacture of combined vaccine including purified Pertussis antigen**

Step 1. Manufacture of hepatitis B vaccine

The hepatitis B vaccine was manufactured using the hepatitis B surface
antigen manufactured in Example 1. aluminum hydroxide solution was
manufactured by adding aluminum hydroxide gel to the phosphate buffer
30 solution. The resultant solution was slowly mixed, and the above antigen

solution was dropped and was mixed by stirring slowly at 4°C for 15 hours for thereby manufacturing hepatitis B vaccine. At this time, the amount of the hepatitis surface antigen was 60µg/ml which was high concentrated three times compared to the amount of the common hepatitis B surface antigen. In the case of the first sample, the amount of the aluminum ion in the aluminum hydroxide gel was 0.9mg/ml. In the case of the second sample, the amount of the aluminum ion in the aluminum hydroxide gel was 1.5mg/ml(as shown in Fig. 2).

10 Step 2. Manufacture of DTP combined vaccine

The DTP combined vaccine was manufactured using each antigen manufactured in the second, third and fourth examples. The aluminum hydroxide solution was manufactured by adding aluminum hydroxide gel to the phosphate buffer solution in the conventional method. As the resultant solution was slowly mixed, each antigen solution was dropped thereto and was mixed by stirring slowly for thereby implementing a uniform adsorption, so that the DTP combined vaccine was manufactured. At this time, the amount of each antigen was concentrated 1.5 times high compared to the amount of each component antigen of common DTP vaccine. The amount of the aluminum ion in the aluminum hydroxide gel was 0.3mg/ml.

Step 3. Manufacture of DTP-hepatitis B combined vaccine

Each DTP vaccine and hepatitis B vaccine manufactured in Steps 1 and 2 were slowly mixed at the volume ratio of 2:1. In the case of the first sample, surplus aluminum hydroxide gel was added so that the amount of the aluminum ion in the aluminum hydroxide gel was finally 0.7mg/ml, and was continuously mixed by stirring at 25°C for 1 hour for thereby manufacturing a stable combined vaccine which does not interact with other components. In the case of the second sample, surplus aluminum hydroxide gel was not added and was continuously mixed by stirring at 25°C for 1 hour for thereby

manufacturing combined vaccine. The amounts of the aluminum ions in the aluminum hydroxide gel of the combined vaccines of the first and second samples were 0.7mg/ml. For the test of antibody titer, the composition of the combined vaccine was 20 μ g of the hepatitis B surface antigen, 25Lf of diphtheria toxoid, 3Lf of tetanus toxoid, 2.5 μ gPN of Pertussis toxoid, and 10 μ gPN of Pertussis FHA antigen(Pertussis FHA(filamentous hemagglutinin) antigen based on 1ml(as shown in Fig. 2).

Example 7

10 Manufacture of combined vaccine including a whole cell Pertussis antigen

Step 1. Manufacture of hepatitis B vaccine

The hepatitis B vaccine was manufactured using the hepatitis B surface antigen manufactured in Example 1. An aluminum hydroxide gel was added to phosphate buffer solution for thereby manufacturing the aluminum hydroxide solution. As the solution was slowly mixed, the above antigen solution was dropped and was fully mixed at 4°C for 15 hours for thereby manufacturing the hepatitis B vaccine. At this time, the amount of the hepatitis B surface antigen was 60 μ g/ml which was concentrated three times high compared to the amount of the common hepatitis B vaccine. In the case of the first sample, the amount of the aluminum ion was 0.9mg/ml in the aluminum hydroxide gel. In the case of the second sample, the amount of the aluminum ion was 1.5mg/ml in the aluminum hydroxide gel(as shown in Fig. 2).

Step 2. Manufacture of DTP combined vaccine

25 The DTP combined vaccine was manufactured using each antigen manufactured in the Examples 2, 3 and 5. The aluminum hydroxide gel was added to the phosphate buffer solution in the conventional method for thereby manufacturing an aluminum hydroxide solution. As the resultant solution was slowly mixed, the above antigen solution was dropped and was fully mixed. A

25
25

uniform adsorption was implemented for thereby manufacturing a DTP combined vaccine. At this time, the amount of each antigen was concentrated 1.5 times high compared to the amount of each component antigen of the common DTP vaccine. The amount of the aluminum ion was 0.3mg/ml in the aluminum hydroxide gel.

Step 3. Manufacture of DTP-hepatitis B combined vaccine

Each DTP vaccine and hepatitis B vaccine manufactured in Steps 1 and 2 were slowly mixed at a volume ratio of 2:1. In the case of the first sample, a surplus aluminum hydroxide gel was added so that the amount of the aluminum ion was finally 0.7mg/ml in the aluminum hydroxide gel, and the resultant solution was continuously mixed at 25°C for 1 hour for thereby manufacturing a stable combined vaccine which does not interact with other components. In the case of the second sample, surplus aluminum hydroxide gel was not added, and the solution was continuously mixed at 25°C for 1 hour for thereby manufacturing a combined vaccine. The amounts of the aluminum ions in the aluminum hydroxide gel of the combined vaccines of the samples 1 and 2 were 0.7mg/ml. For the test of antibody titer, the composition of the combined vaccine was 20µg of the hepatitis B surface antigen, 50Lf of diphtheria toxoid, 10Lf of tetanus toxoid, and 20OE of a whole cell Pertussis antigen based on 1ml(as shown in Fig. 2).

Example 8. Test of antigenicity in combined vaccine

The test of antigenicity in combined vaccine manufactured by the examples 6 and 7 was performed by the Enzyme Immuno Assay (EIA) using monoclonal antibody and polyclonal antibody by comparison to the standard of each antigen with respect to each antigen content.

In addition, the antigen adsorbed to the aluminum salt was removed by the centrifugation for measuring the adsorption ratio of each antigen, and the amount of the separated antigen was measured using the upper solution.

The average of each result were shown in Figs. 1 and 2 shows relative antigenicity of each antigen.

Example 9. Test of antibody formation by combined vaccine

5 **Test of antibody formation by hepatitis B surface antigen**

The combined vaccine and hepatitis B vaccine manufactured In Examples 6 and 7 were inoculated to ICR mice in which 16 mice were grouped as the group 1, and a blood was collected from the ICR mice after 18 days. Serum was separated from the blood. The antibody level against the hepatitis
10 B surface antigen was obtained based on the unit of IU/ml using the EIA(Enzyme Immuno Assay) and calculated as in geomean antibody titer. The titer of the combined vaccine was computed with respect to the hepatitis B vaccine.

Fig. 2c and 2d shows relative antibody titer of combined vaccine with
15 respect to each antigen and Table 1 shows the values of each titer.

Test of antibody formation by diphtheria antigen

The combined vaccine and DTP vaccine manufactured in Examples 6 and 7 were inoculated to the ICR mice in which 16 mice are grouped as the
20 group 1. The blood was collected from the CIR mice after 28 days. Serum was separated from the blood. The antibody level against the diphtheria antigen of the serum was measured using the EIA(Enzyme Immuno Assay) based on the unit of IU/ml and calculated as in geomean antibody titer. Thereafter, the titer of the combined vaccine was measured compared to the DTP vaccine.

25 Fig. 2c and 2d shows relative antibody titer of combined vaccine with respect to each antigen, and Table 1 shows the values of each titer.

Test of antibody formation by tetanus antigen

The combined vaccine and DTP vaccine manufactured In Examples 6
30 and 7 were inoculated to the ICR mice in which 16 mice are grouped as the

37
27

group 1. The blood was collected from the ICR mice after 28 days. Serum was separated from the blood. The antibody level against the tetanus antigen of the serum was measured using the EIA(Enzyme Immuno Assay) based on the unit of IU/ml and calculated as in geomean antibody titer. Thereafter, the titer of the combined vaccine was measured compared to the DTP vaccine.

Fig. 2c and 2d shows relative antibody titer of combined vaccine with respect to each antigen, and Table 1 shows the values of each titer.

Test of antibody formation by Pertussis antigen

The combined vaccine and DTP vaccine manufactured in Examples 6 and 7 were inoculated to the ICR mice in which 16 mice are grouped as the group 1. The blood was collected from the ICR mice after 28 days. Serum was separated from the blood. The antibody level against pertussis antigen of the serum was measured using the EIA(Enzyme Immuno Assay) based on the unit of IU/ml and as in geomean antibody titer. Thereafter, the titer of the combined vaccine was measured compared to the DTP vaccine.

Fig. 2c and 2d shows relative antibody titer of combined vaccine with respect to each antigen, and Table 1 shows the values of each titer.

20

25

30

Table 1

	DTwP vaccine (Aluminium Phosphate as an adsorbent)	DTwP vaccine (Aluminium Hydroxide as an adsorbent)	DTwP-HepB combined vaccine (Sample A)	DTwP-HepB combined vaccine (Sample B)	Criterion of Titer
Diphtheria Potency(IU/ml)	>800	248.7	801.1	128.1	Over 30 IU/ml
Tetanus Potency(IU/ml)	178.5	186.0	216.9	230.7	Over 40 IU/ml
Pertussis Potency(IPU/ml)	20.2	3.2	25.4	5.5	Over 8 IPU/ml
Hepatitis B Relative Potency(%)	-	-	196.8	103.9	Equal or over Value of Standard sample

Example 10.**Comparative effectiveness test with monkey**

- 5 A test was performed for proving the immunogenicity in a primate of the combined vaccine and comparing with the conventional single vaccine. The combined vaccine manufactured in Example 6 was vaccinated to six monkeys (group 2) formed of the same numbers of male and female monkeys, and each component vaccine was vaccinated to 6 monkeys (group 1) formed of the same
- 10 numbers of male and female monkeys simultaneously. The same products as the products vaccinated to each group was re-vaccinated 30th and 60th days. The blood was collected from each experimental animal on 1st, 29th, 58th, and 86th days from the initial vaccination date, and the antibody titer against each disease was measured based on the ELISA method proper to the serum of the
- 15 monkey.

Fig. 3 shows the geomean antibody titer against each antigen of each group.

29
29**INDUSTRIAL APPLICABILITY**

According to the present invention, it is directed to a method for manufacturing a combined vaccine for concurrently preventing the diseases such as diphtheria, tetanus, pertussis, and hepatitis B, etc. which should be prevented in an infant. By the present invention, it is possible to concurrently prevent the diseases such as diphtheria, tetanus, pertussis, and hepatitis B which should be prevented in an infant using the combined vaccine according to the present invention.

As the present invention may be embodied in several forms without departing from the spirit or essential characteristics thereof, it should also be understood that the above-described embodiments are not limited by any of the details of the foregoing description, unless otherwise specified, but rather should be construed broadly within its spirit and scope as defined in the appended claims, and therefore all changes and modifications that fall within the meets and bounds of the claims, or equivalences of such meets and bounds are therefore intended to be embraced by the appended claims.

30/00

CLAIMS

1. A manufacturing method of a combined vaccine, comprising the steps of:
 - adsorption step of independently adsorbing each protective antigen to adsorbent respectively with respect to various diseases; and
 - combination step of mixing each mentioned protective antigen adsorbed to the adsorbent .
2. The method of claim 1, wherein the protective antigen is the antigen selected from the group comprising diphtheria antigen, tetanus antigen, pertussis antigen, hepatitis B antigen, or two or more combination thereof.
3. The method of claim 1, wherein the adsorbent is aluminum hydroxide gel.
4. The method of claim 3, wherein aluminum ion concentration of the aluminum hydroxide gel after the manufacture of a combined vaccine is in the range of 0.5~1.25mg/ml.
5. The method of either claim 3 or 4, further comprising a step of:
 - adding the adsorbent in which the final aluminum ion concentration does not exceed in the range of 0.5 ~1.25mg/ml in aluminum hydroxide gel.
6. The method of claim 2, wherein a recombinant hepatitis B surface antigen as the hepatitis B antigen is combined by the amount of 5~10 μ g based on the pediatric dose.
7. The method of claim 6, further comprising a step of:
 - adding a neutral surfactant such as polysorbate 20, polysorbate 80 and triton X-100.

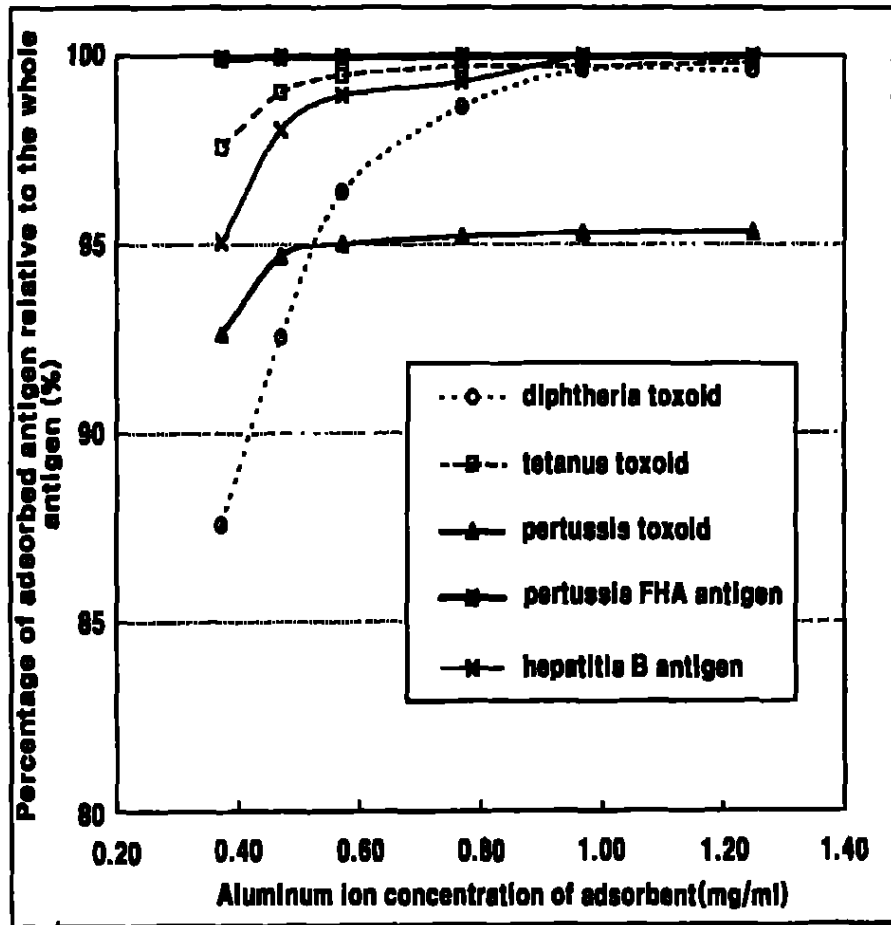
31/01

8. The method of claim 6, wherein said hepatitis B antigen is mixed by stirring with an adsorbent at 2~8°C for 3~20 hours and is matured and adsorbed.
9. The method of claim 2, wherein the diphtheria toxoid detoxified as a diphtheria antigen is combined by the amount of 10~25Lf based on the pediatric dose.
10. The method of claim 2, wherein the tetanus toxoid detoxified as a tetanus antigen is combined by the amount of 1~5Lf based on the pediatric dose.
11. The method of claim 2, wherein the pertussis antigen including the purified antigens is combined by the amount below 20µgPN based on the pediatric dose or the whole cell pertussis antigen is combined by the amount below 200E based on the pediatric dose.
12. The method of claim 11, wherein mentioned purified pertussis antigens include pertussis toxoid and pertussis FHA (filamentous hemagglutinin).
13. A combined vaccine as produced according to any of the methods claimed in Claims 1 to 12.

32 82

1/5

Fig. 1



33

2/5

Fig. 2a

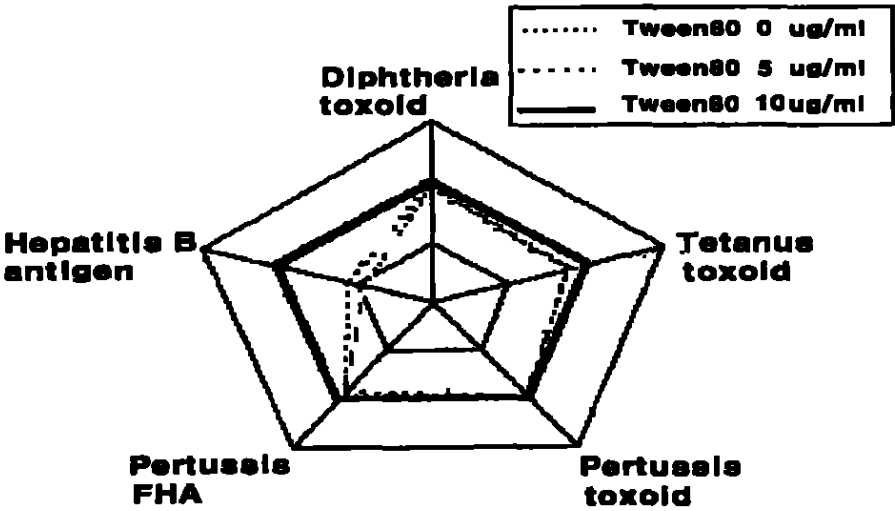
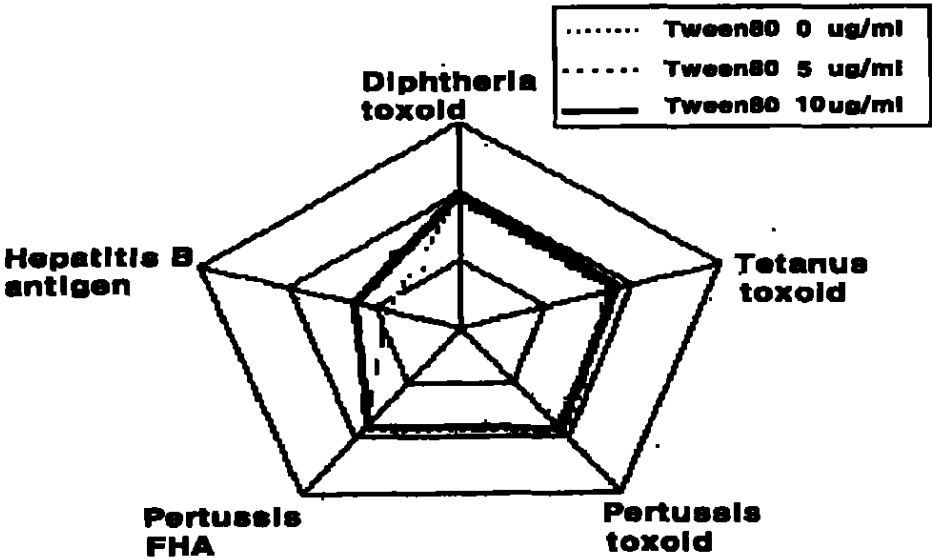


Fig. 2b



34
34

3/5

Fig. 2c

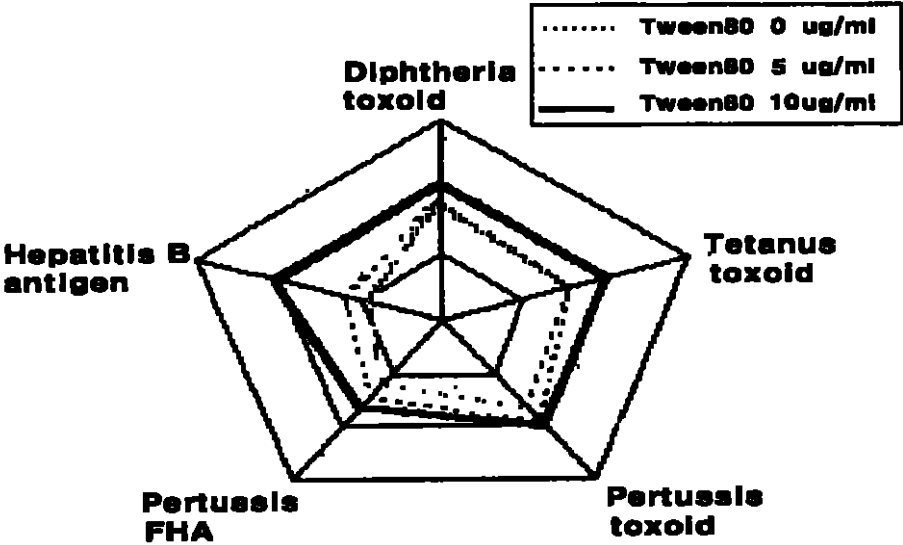
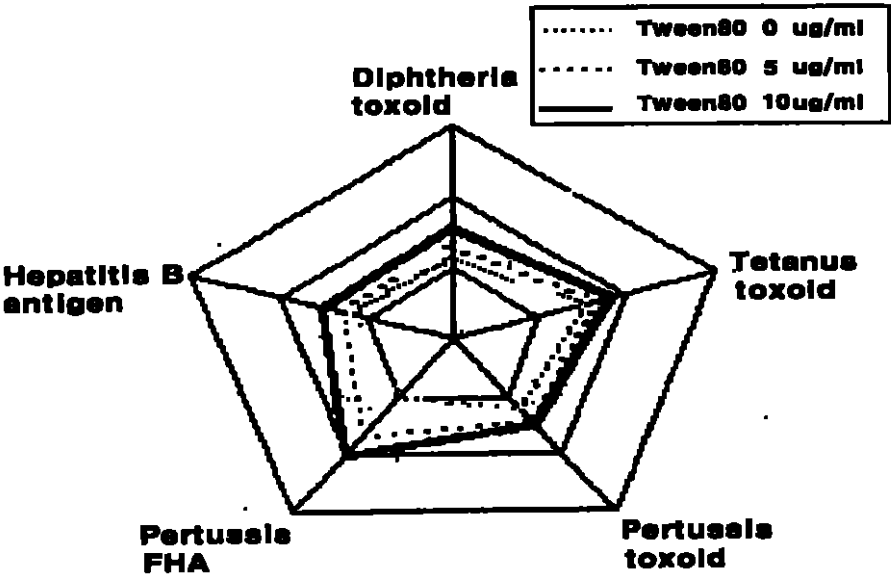


Fig. 2d



35
35

4/5

Fig. 3a

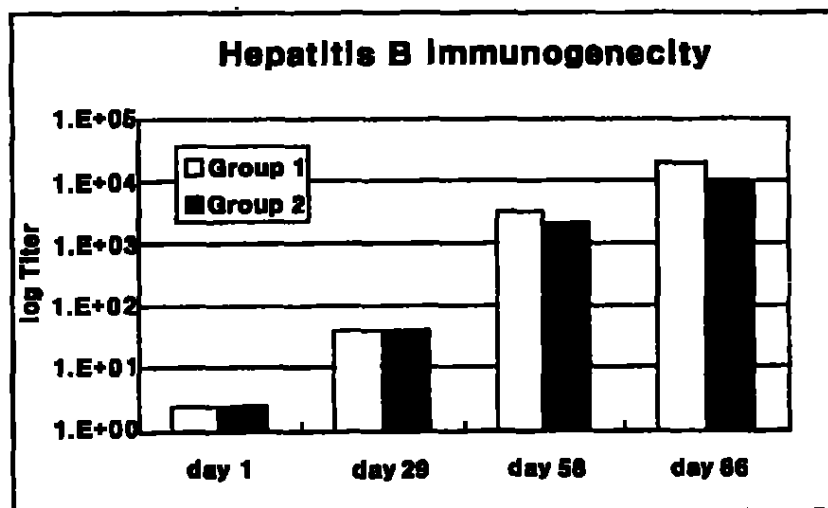
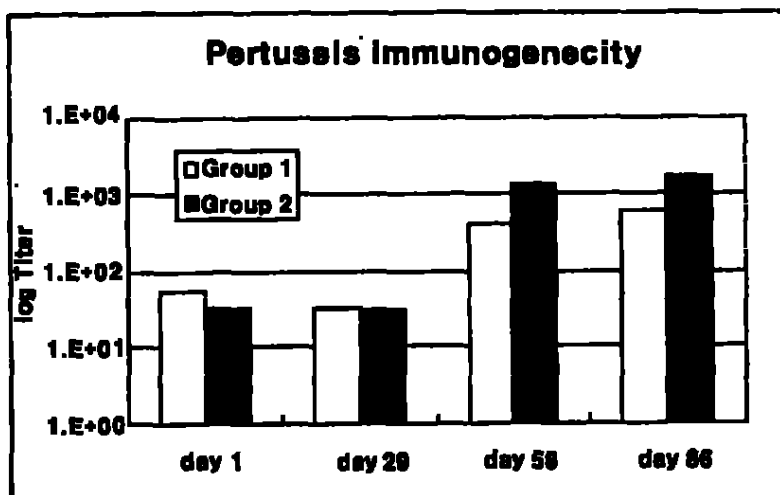


Fig. 3b



5/5

Fig. 3c

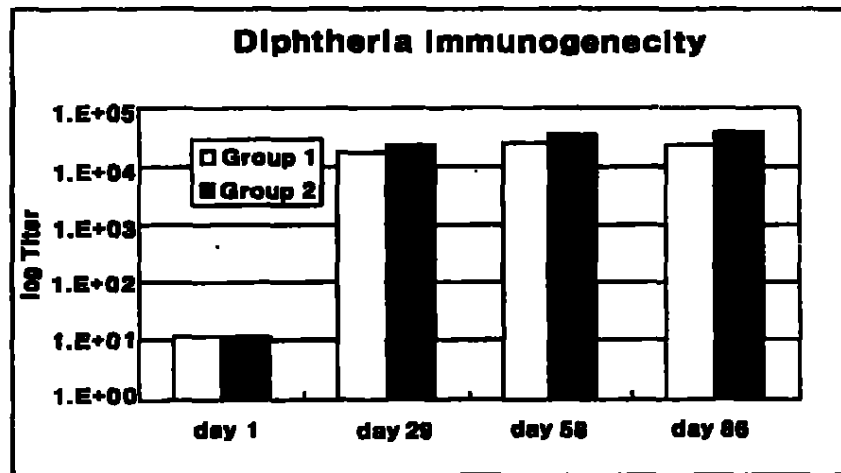
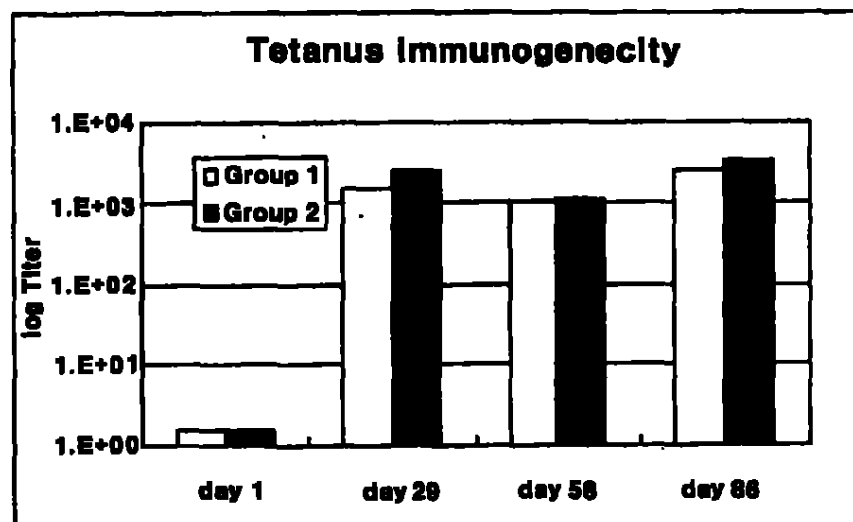


Fig. 3d



MÉTODO DE FABRICACIÓN DE VACUNA COMBINADA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al método de fabricación de vacuna combinada capaz de prevenir simultáneamente varias enfermedades de infantes, tales como difteria, tétano, tos ferina, hepatitis B, y otras enfermedades, que deben ser prevenidas en los infantes.

10

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15

Una vacuna combinada está dirigida a una vacuna fabricada mediante la combinación de antígenos protectivos para cada enfermedad con respecto a varias enfermedades infecciosas o una vacuna fabricada mediante la combinación de varios antígenos relacionados para prevenir una enfermedad infecciosa.

20

Como ejemplos de lo anterior, existen: una vacuna DTP capaz de aumentar una Inmunidad con respecto a la difteria, tétano y tos ferina, una vacuna MMR capaz de aumentar una inmunidad con respecto a sarampión, paperas, y sarampión alemán, y enfermedades infecciosas similares. Las vacunas anteriores han sido empleadas durante 20 años. Como ejemplos de las últimas, existen una vacuna de neumococo fabricada mediante la combinación de 14 o 23 polisacáridos de neumococo capaz de aumentar una inmunidad a la neumonía, y una vacuna de meningococo fabricada mediante la combinación de 4 polisacáridos de meningococo, capaz de aumentar una inmunidad para proteger la meningitis, y enfermedades infecciosas similares. Las vacunas anteriores han sido empleadas por algunos años.

25

Las vacunas anteriores han sido empleadas por muchos años, debido a su desarrollo son bien reconocidas por sus altos efectos inmunogénicos y menores efectos colaterales, con relación a cada enfermedad infecciosa y con su buena adaptación para proteger varias enfermedades. Los desarrolladores de vacunas están diseñando recientemente varios tipos de vacunas combinadas por las razones anteriores. Como las vacunas combinadas anteriores, existen: una vacuna (Publicación Internacional No. 99/13906) fabricada mediante la combinación de una vacuna DTP, vacuna de encefalomeningitis bacterial (vacuna Hib), vacuna de polio inactivado, y vacuna de hepatitis B. Una vacuna combinada es desarrollada mediante la combinación de polisacáridos neumococo y meningococo conjugados con proteína. Una vacuna capaz de prevenir la infección intestinal relacionada con cada bacteria causante de cólera, tifoidea, disentería, y diarrea, será desarrollada pronto.

La vacuna combinada preparada cuando se combina cada antígeno para prevenir otras enfermedades infecciosas tiene ventajas ya que disminuye el número de vacunaciones, y el suministro de vacunas es simple, por lo tanto disminuye el costo. De acuerdo con el programa de vacunación infantil recomendado por la Asociación Pediátrica (1997), los infantes reciben muchas vacunas dentro del primer año luego del nacimiento, y una inyección de vacuna algunas veces, se superpone con diferentes vacunas debido a conveniencia o enfermedad. Por lo tanto, es importante inocular los infantes basado en un método apropiado, y de este modo proporcionar una cierta conveniencia tanto para las personas vacunadas como para las personas inoculadas. En particular, como el programa de vacunación estandarizado, las vacunaciones de DTP y de hepatitis B son programadas para realizar tres veces vacunaciones primarias dentro del primer año de los infantes y vacunas de refuerzo. Adicionalmente, dado que los programas de vacunación recomendados son similares, se puede presentar el problema de vacunas que se superponen.

39
3a

5

Los inventores de la presente invención realizaron una investigación para proporcionar una cierta conveniencia para la vacunación, tanto para las personas vacunadas como para las personas inoculadas mediante el desarrollo de la vacuna combinada de las vacunas de DTP y de hepatitis B y la estabilización del suministro de la vacuna, y de este modo proporcionar un beneficio de vacunación para más personas.

10

Dado que la investigación sobre la vacuna combinada está principalmente dirigida a combinar cada antígeno componente de los productos de vacuna, el cual es proporcionado en la inmunidad y estabilidad, es importante para la investigación anterior el desarrollo del método de combinación, importante para minimizar la variación en la reacción e inmunidad que ocurre debido a una interacción entre cada antígeno protector y el adsorbente. Con la culminación del desarrollo, se han revisado la homogeneidad y estabilidad de las formulaciones de vacunas combinadas. En la presente invención, la investigación ha sido realizada con base en la vacuna DTP y la vacuna de hepatitis B, las cuales son probadas por su inmunidad y estabilidad.

15

20

25

Como un método para combinar cada vacuna componente, existen: un método (Publicación Internacional Nos. WO 99/13906 y WO 00/7623) de simple combinación de productos de cada vacuna componente, un método (Publicación Internacional No. WO 99/13906) de administración simultáneamente cuando la vacunación se realiza, empleando el contenedor diseñado especialmente, y un método de fabricación de vacuna combinada por mezcla de cada componente de vacuna e ingredientes en una formulación. En lo que respecta al suministro de vacuna, el empleo de la vacuna combinada preparada por los dos métodos anteriores son similares al empleo de cada vacuna monovalente de manera individual, requiere de más atención para manejar vacunas que cada vacuna monovalente, tanto así que no existe una ventaja emplear este tipo de vacuna combinada. Adicionalmente, no es posible realizar una investigación respecto a la variación de la inmunidad y la de los efectos

colaterales. Por lo tanto, es preferible que cada componente de vacuna sea mezclado en una formulación como un producto en la investigación de la vacuna combinada.

- 5 El propósito de la presente invención es proporcionar un método de fabricación de vacuna combinada capaz de prevenir varias enfermedades de infantes que incluyen difteria, tétano, tos ferina y hepatitis B, que deben ser prevenidas en infantes.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

10

De conformidad, es un objeto de la presente invención proporcionar el método de fabricación de vacuna combinada para prevenir simultáneamente varias enfermedades de infantes tales como difteria, tétano, tos ferina y hepatitis B, que deben ser prevenidas en infantes.

15

Con el fin de alcanzar el objeto anterior, se proporciona un método de fabricación de una vacuna combinada, que comprende las etapas de:

La etapa de adsorción de adsorber de manera independiente cada antígeno protector a un adsorbente respectivamente con respecto a varias enfermedades; y

20

La etapa de combinación de mezclar cada antígeno protector mencionado adsorbido al adsorbente.

25

Y también proporciona el método en donde el antígeno protector es el antígeno seleccionado del grupo que comprende el antígeno de difteria, antígeno del tétano, antígeno de la tos ferina, antígeno de la hepatitis B, o dos o más combinaciones de los mismos.

Y también proporciona el método, en donde el adsorbente es gel de hidróxido de aluminio.

Y, con el fin de alcanzar el objeto anterior, se proporciona una vacuna combinada como se produce de acuerdo con cualquiera de los métodos anteriores.

5 Más específicamente, la presente invención proporciona el método de fabricación de una vacuna combinada que incluye las etapas de adsorción de manera independiente de cada antígeno protector a un adsorbente de un gel de hidróxido de aluminio con respecto a varias enfermedades tales como la difteria, tétano, tos ferina, y hepatitis B que deben ser prevenidas en los infantes, y la combinación de cada antígeno protector adsorbido al
10 adsorbente luego de la adsorción.

Los antígenos de la presente invención no están limitados por las enfermedades mencionadas pero aplican a varios antígenos de varias enfermedades.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente invención será entendida mejor con referencia a los dibujos que la acompañan que son únicamente proporcionados a manera de ilustración y por lo tanto no limitan la presente invención, donde;

20 La Fig. 1 es una vista que ilustra una proporción de adsorción de cada antígeno componente basado en la concentración de un adsorbente. El toxoide de difteria, el toxoide del tétano, y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B son componentes del antígeno de difteria, del antígeno del tétano, y del antígeno de la hepatitis B, y el toxoide de tos ferina y el
25 antígeno de tos ferina FHA (Corpúsculo aglutinante de sangre en forma de hilo de tos ferina) son cada uno de los componentes de un antígeno de tos ferina purificado;

42

5

La Fig. 2a a 2d son vistas que ilustran una antigenicidad e inmunidad basadas en un método de adsorción, en donde la muestra 1 es una muestra en que el excedente del gel de hidróxido de aluminio se adiciona después de que la combinación de cada vacuna componente se completa, y la muestra 2 es una muestra en que dicho adsorbente de la misma concentración es previamente adicionado antes de que la combinación sea completa; las Figs. 2a y 2b son vistas que ilustran la antigenicidad relativa de las muestras 1 y 2 respectivamente y, las Figs. 2c y 2d son vistas que ilustran el nivel relativo de formación de anticuerpo contra cada antígeno de las muestras 1 y 2 respectivamente.

10

La Fig. 3 es una vista que ilustra el nivel de formación de anticuerpo contra cada antígeno en el suero obtenido de monos a los que se administró una vacuna combinada preparada de acuerdo con la presente invención o simultáneamente cada producto de vacuna de DTP y hepatitis B, basado sobre la fecha de recolección de las muestras de sangre de cada mono. El grupo 1 está designado respecto de cada vacuna de DTP y hepatitis B administradas simultáneamente, y el grupo 2 está designado respecto de una vacuna combinada administrada.

15

MODOS PARA LLEVAR A CABO LAS REALIZACIONES PREFERIBLES

20

Como método para fabricar la vacuna combinada que contiene cada vacuna componente como un producto, el método anterior se divide en dos etapas: un método para la etapa de combinación de antígenos que forman cada vacuna componente y que realiza una adsorción empleando un adsorbente y un método para la etapa de combinación de los antígenos previamente adsorbidos, en el caso que un adsorbente sea empleado como un componente en dicho método. Sin embargo, en el caso que cada antígeno componente sea mezclado primero, una capacidad de adsorción con respecto al adsorbente de cada antígeno puede disminuir debido a la interacción entre antígenos e ingredientes en solución. Adicionalmente,

25

43

✓

la adsorción entre el adsorbente y el antígeno componente se optimiza bajo cada condición independiente. Si los procesos de adsorción anteriores son realizados simultáneamente, la proporción de adsorción puede ser disminuida debido a una diferencia en la condición de adsorción de cada antígeno componente. Dado que la interrelación entre la proporción de adsorción con respecto al adsorbente del antígeno componente y la inmunidad de la vacuna es en proporción inversa, la Inmunidad de la vacuna combinada, que es fabricada el proceso realizado simultáneamente, puede ser disminuida comparada a la inmunidad de cada vacuna monovalente.

Por lo tanto, los Inventores de la presente invención han juzgado que es apropiado fabricar una vacuna combinada mediante la preparación de una solución a granel de cada antígeno componente, realizando de manera independiente una adsorción de cada antígeno y combinando juntos los antígenos adsorbidos.

Adicionalmente, en el caso que cada antígeno componente sea combinado en cada tipo de adsorción, la concentración final de cada antígeno componente en la vacuna combinada debe ser la misma a la concentración del antígeno componente en cada vacuna monovalente convencional, para comparar la inmunidad y las características de los antígenos de vacuna en los productos de vacuna. Por lo tanto, para fabricar la vacuna combinada, el antígeno componente más concentrado que una vacuna individual es adsorbida y luego combinada. La vacuna DTP es fabricada con base en una adsorción empleando el antígeno que es concentrado 1.5~2 veces, y la vacuna de hepatitis B es fabricada empleando el antígeno que es concentrado 2~3 veces. La concentración final de cada antígeno componente de la vacuna combinada de acuerdo con la presente invención se hace coincidir con la concentración de cada vacuna individual ajustando la proporción de combinación de cada antígeno.

De acuerdo con la presente invención, los inventores realizaron varios estudios de combinaciones para desarrollar la vacuna combinada. En este caso, el contenido final de cada componente inmune en un producto de vacuna es el mismo que el contenido de la

5 vacuna monovalente. Adicionalmente, el cambio de la proporción de adsorción de cada antígeno es monitoreado mediante el control del contenido del adsorbente y otros componentes. Cada muestra que tiene un cambio mínimo en la proporción de adsorción es inmunizada dentro de pequeños animales para comparar el nivel de la formación de anticuerpos. Un método de combinación adecuado fue seleccionado mediante la revisión de

10 resultados de formación de anticuerpos en animales pequeños.

Adicionalmente, como resultado de la revisión con respecto a los adsorbentes de la vacuna actualmente comercializada DTP y la vacuna de hepatitis B, el gel de hidróxido de aluminio, y el gel de fosfato de aluminio fueron principalmente empleados. Se sabe que la adsorción de

15 la proteína a cada gel de aluminio es causada por una carga eléctrica en la superficie de cada proteína y un componente gel. Y también se sabe que el gel de hidróxido de aluminio tiene una carga eléctrica de superficie positiva en un rango de pH fisiológico, y el gel de fosfato de aluminio tiene una carga eléctrica de superficie negativa (*"Vaccine Design- The subunit and Adjuvant approach"* ("Enfoque de subunidad y adyuvante"), ed. Por M.F. Powell

20 & M. J. Newman, 1995, p 229-239). En el caso en que los dos tipos anteriores de geles de aluminio sean empleados simultáneamente, ocurre una determinada interacción, para que el tamaño de partícula en la solución pueda ser aumentado, y la capacidad de adsorción a la proteína pueda ser disminuida. Adicionalmente, la carga eléctrica de superficie de cada antígeno componente de la vacuna de hepatitis B y la vacuna combinada tiene generalmente

25 una carga eléctrica de superficie negativa en un rango de pH fisiológico. Por lo tanto, el gel de hidróxido de aluminio es adecuado como un adsorbente.

45
45



En la técnica convencional, el componente del adsorbente tal como el gel de hidróxido de aluminio y el gel de fosfato de aluminio fue co-empleado (Publicación Internacional No. WO 93/24148) pero con base en la razón anterior, los inventores de la presente invención consideraron que el adsorbente de la vacuna combinada debe tener el mismo tipo de sal, y el gel de hidróxido de aluminio empleado como un adsorbente, es un factor importante para obtener una proporción de adsorción segura de cada antígeno componente.

Pero es evidente que el adsorbente no solo cubre el gel de hidróxido de aluminio sino también sus equivalentes en la presente invención.

Adicionalmente, en la vacuna combinada preparada mediante la presente invención, otros antígenos componentes excepto el antígeno de la hepatitis B incluyen proteínas como un componente principal, en tanto que, en el caso de la vacuna de la hepatitis B, el antígeno existe generalmente en un tipo de partícula que incluye una capa de fosfolípido. Por lo tanto, se prefiere que cuando se fabrique la vacuna de la hepatitis B para una vacuna combinada preparada mediante la presente invención, con el fin de disminuir una cierta interferencia por otros antígenos con respecto al componente fosfolipídico del antígeno de la vacuna de la hepatitis B que incluye una capa de fosfolípido, se adicione un surfactante neutro tal como Polisorbato 20 (Tween 20), Polisorbato 80 (Tween 80) y Triton X-100.

Dado que el título de la vacuna de hepatitis B tiende a disminuir en caso de que la cantidad del surfactante neutro sea alto, es preferible que el surfactante neutro se adicione a la razón de masa por debajo del 50% con respecto a la cantidad de proteína del antígeno de superficie de la hepatitis B pero la cantidad anterior no se limita en la presente invención.

En la presente invención, *Difteria corynebacterium*, PW No. 8 como un antígeno de la difteria se prepara y cultiva en un medio de cultivo adecuado. Se prefiere el toxoide de difteria, el

cual es obtenido por destoxificación de la toxina de difteria que es purificada mediante un método convencional. La cantidad del antígeno es preferiblemente 10~25 Lf basado en la dosis pediátrica. Como un antígeno de tétano, el tetanii Clostridium, Harvard, es cultivado en un medio de cultivo adecuado bajo condición anaeróbica. El toxoide del tétano, el cual es obtenido por destoxificación de la toxina del tétano se purifica por el método convencional adecuado. La cantidad del antígeno es preferiblemente 1~5 Lf basado en la dosis pediátrica. Adicionalmente, el antígeno de Tos ferina es cultivado en un medio de cultivo adecuado empleando Bordetella pertussis, Tohama fase I, y múltiples clases de proteína de antígeno que incluye un toxoide de Tos ferina que son purificados por un método convencional en un sobrenadante de cultivo y destoxificado. Los antígenos de tos ferina purificados o un antígeno de célula completa de tos ferina es adecuado. Aquí, se proporciona el método de fabricación de una vacuna combinada el cual en el caso de las múltiples clases de antígenos, la cantidad total de los antígenos está por debajo de 20µgPN basado en la dosis pediátrica, y en el caso del antígeno de célula completa de tos ferina, la cantidad del antígeno esta preferiblemente por debajo de 20 OE basado en la dosis pediátrica. La presente invención está dirigida adicionalmente, a un método para fabricar una vacuna combinada en que las múltiples proteínas de antígeno purificadas incluyen un toxoide de tos ferina destoxificado y antígeno de hemaglutinina filamentosa (FHA).

Preferiblemente, la presente invención está dirigida a un método para la fabricación de una vacuna combinada de tal manera que la cantidad de antígeno de superficie del virus de hepatitis B recombinante, el cual se fabrica por un método de ingeniería genética como un antígeno de hepatitis B, es 5~10ug basado en la dosis pediátrica. Más preferiblemente, la presente invención está dirigida a un método para fabricar de tal manera que el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, es adsorbido a un adsorbente mediante mezcla con agitación a 2~8°C por 3~20 horas. Con el fin de encontrar el contenido óptimo de adsorbente

para la fabricación de la vacuna combinada, la proporción de adsorción para cada antígeno componente fue analizada a cada concentración de adsorbente. Como resultado, cuando la concentración final del ión aluminio está por debajo de 0.5mg/ml al momento en que la combinación final se completa, la proporción de absorción de cada antígeno fue relativamente disminuida (como se muestra en la Fig. 1). Adicionalmente, la concentración del ión aluminio esta estipulada para ser por debajo de 1.25mg/ml en el gel de aluminio empleado para la vacuna por regulación (WHO, *"Requirements for diphteria, tetanus, pertussis and combined vaccines"* ("Requerimientos para difteria, tétano, tos ferina y vacunas combinadas") en Technical Report Series Nos. 800, 1990, p 87~179). Por lo tanto, como el gel de hidróxido de aluminio, la concentración final del ión aluminio esta preferiblemente en el rango de 0.5~1.25mg/ml y más preferiblemente en el rango de 0.7mg/ml.

Adicionalmente, con el fin de prevenir una posibilidad que la proporción de adsorción de cada antígeno componente se disminuya por una fuerza de repulsión causada entre cada antígeno componente, incluso después de que la combinación de cada componente se complete, la antigenicidad y el nivel de formación de anticuerpo de cada antígeno componente son convertidos al porcentaje relativo para comparar aquellos valores entre dos muestras: una muestra en la que el otro componente excepto un gel de hidróxido de aluminio es previamente combinado y luego se añade adicionalmente exceso de gel de hidróxido de aluminio y una muestra en la que el adsorbente de la misma concentración es previamente adicionado antes de que la combinación se complete. El cambio de la antigenicidad y el nivel de formación de anticuerpo disminuyen cuando el exceso de adsorbente se adiciona incluso luego de que la combinación de cada componente se complete (como se muestra en la Fig. 2).

Adicionalmente, en el caso de la muestra en que el polisorbato 80 (Tween 80) se adiciona, la antigenicidad y título con respecto a la hepatitis B fueron mantenidos (como se muestra en la Fig. 2). Se espera que un resultado similar se pudiera obtener incluso cuando surfactantes neutros tales como polysorbato 20 y tritón X-100 son usados dentro de la concentración adecuada. Como se muestra en la Fig. 2, la muestra 1 y la muestra 2 son preparadas de forma que el exceso de gel de hidróxido de aluminio es añadido de manera adicional después de que la combinación de cada componente se completa, y que el adsorbente de la misma concentración es previamente adicionado antes de que la combinación se complete, respectivamente.

Preferiblemente, la presente invención está dirigida a un método para fabricar una vacuna combinada en la cual, la concentración del ión aluminio del gel de hidróxido de aluminio está en un rango de 0.5~1.25mg/ml. Más preferiblemente, la presente invención está dirigida a un método para fabricar una vacuna combinada que incluye una etapa de adición de exceso de adsorbente en el rango que no excede el rango de concentración del ión aluminio de 0.5~1.25mg/ml después de que son combinados los antígenos protectivos adsorbidos al adsorbente. En una realización preferible de la presente invención, es posible mantener una adsorción inherente de cada antígeno componente en la vacuna combinada y aumentar una inmunidad.

Como el antígeno de tos ferina, un antígeno de tos ferina purificado es empleado de manera general en Corea y otros varios países. Dado que en algunos países Americanos y países del tercer mundo emplean el antígeno de célula completa de tos ferina, el cual es destoxificado. Por lo tanto en la presente invención, el rango aplicable de la vacuna combinada se amplía por el estudio sobre el método de combinación que emplea el antígeno de célula completa de tos ferina. En este caso, la combinación fue realizada en el

99
42

mismo método como se emplea el mencionado antígeno de tos ferina purificado y de este modo obtener una muestra capaz de mantener una inmunidad de cada componente (como se muestra en la Tabla 1).

5

En el caso de la vacuna DTP que incluye el antígeno de célula completa de tos ferina, un gel de fosfato de aluminio es generalmente empleado como un adsorbente. Sin embargo, con el fin de fabricar una vacuna combinada con respecto al antígeno de la hepatitis B, la vacuna DTP fue fabricada empleando el gel de hidróxido de aluminio. En este caso, la inmunidad con respecto a la tos ferina fue disminuida, pero cuando un exceso de gel de hidróxido de aluminio fue añadido de manera adicional luego de que la combinación de cada vacuna componente estuvo completa (muestra A), fue posible mantener una inmunidad deseada. Como una referencia, la muestra B es preparada de tal forma que el adsorbente de la misma concentración fue previamente adicionado antes de que la combinación se completara.

10

15

La seguridad y eficacia de la vacuna combinada fabricada de acuerdo con la presente invención fueron probadas con base en los siguientes métodos. Primero, una sobredosis de vacuna combinada fue administrada a un roedor, y se comprobó que no se observara lesión como resultado de la biopsia (No se proporciona el resultado de la misma). Adicionalmente, el nivel de anticuerpos contra cada antígeno fue medido en un grupo (grupo 2) en el cual se administró una vacuna combinada a un mono y en un grupo (grupo 1) en el cual cada vacuna de DTP y hepatitis B fue administrada simultáneamente. Como resultado de la prueba-t con respecto a la cantidad de anticuerpos entre los dos grupos, cuando se compara el resultado del grupo 2 con el resultado del grupo 1, se evaluó que la vacuna combinada mostró inmunogenicidad igual o mejor contra cada antígeno que un grupo de inyecciones simultáneas de cada vacuna (como se muestra en la Fig. 3. No se proporcionan los resultados de la estadística).

20

25



En conclusión, el método de combinación se desarrolló en la presente invención, en el cual una interacción entre diferentes componentes inmunes fue minimizada, y cada efecto inmunogénico no disminuyó. Cuando se divide cada componente inmune empleado por la vacuna combinada con base en propiedades físicas y químicas, los componentes inmunogénicos pueden dividirse en un antígeno de proteína (antígeno de difteria, antígeno del tétano, antígeno de tos ferina purificado), un antígeno compuesto de proteína y capa fosfolipídica (antígeno de la hepatitis B), y un antígeno compuesto de célula completa muerta (un antígeno de célula completa de tos ferina), etc. Por lo tanto, se puede predecir que una combinación con otro antígeno de vacuna individual puede implementarse con base en las características físicas y químicas de los componentes. Una combinación de una vacuna adicional puede ser posible con respecto a las enfermedades (influenza hemofilus, polio), que deben ser prevenidas en los infantes por la combinación de vacunas preparadas de acuerdo con la presente invención.

El período de vacunación del cuerpo del agente del agente de vacuna combinada de acuerdo con la presente invención puede ser los periodos de vacunación anteriores de la vacuna DTP o la vacuna de la hepatitis B. En el caso que exista el antígeno de la hepatitis B en el cuerpo de la madre, es preferible inocular tres veces en el segundo, cuarto y sexto mes. En caso de que no exista la hepatitis B en el cuerpo de la madre, como periodo de vacunación apropiado, la vacuna de la hepatitis B es inculada de manera individual después del nacimiento, y luego la vacunación adicional se realiza empleando una vacuna combinada. Una adecuada vacunación con respecto a los Infantes puede ser llevada a cabo mediante el método de inyección muscular o hipodérmica. La dosis del antígeno de difteria, tétano, tos ferina y hepatitis B respectivamente en la vacuna combinada de acuerdo con la presente invención, es la misma que la dosis para el infante del antígeno de cada vacuna individual.

Ejemplo 1

Fabricación del antígeno de hepatitis B

5

10

15

20

25

La célula de levadura que es capaz de expresar el antígeno de superficie de la hepatitis B mediante el método de Ingeniería genética es cultivada de manera intensiva. 1Kg del precipitado de células de levadura el cual es obtenido por la centrifugación, es diluido a una proporción de 1:2 en una solución amortiguadora (NaCl 0.5M, EDTA 10mM, timerosal 0.01%, fosfato 0.1M, pH 7.0). La solución diluida fluye a través de un beator de botón de vidrio (o Dinomil) para de este modo romper las paredes celulares y así sucesivamente. La solución obtenida se adiciona con un surfactante neutro (grupo tween o grupo Tritón) por 0.5% y se mezcla de manera uniforme por agitación a 4°C. El hidróxido de sodio fue adicionado a la solución resultante para de este modo obtener un pH de 11 y luego se mezcla por agitación a 4°C por 5 horas. Una solución diluida de ácido clorhídrico se adiciona a la solución resultante para de este modo obtener un pH de 4. El precipitado se retira por centrifugación a 6000 rpm por 15 minutos, empleando una máquina centrífuga (ROTOR: JA-14, Beckman Inc. USA), y se obtuvo la solución superior que incluye el antígeno de superficie de la hepatitis B. El pH de la solución superior se ajustó a 7, y luego se le adicionó sílica y se mezcló a 4~25°C por 3~16 horas, para que el antígeno de superficie de la Hepatitis B fuera adsorbido a la sílica. La sílica gel que es preferiblemente empleada en la presente invención es Aerosil 380 (Degussa, USA) que incluye sílica fina de hidratación o sílica anhidra que tiene un área de superficie válida de 100~500mm²/g. Con el fin de retirar contaminantes de la sílica para que el antígeno de superficie de la hepatitis B sea adsorbido, la solución resultante fue lavada dos veces empleando una solución amortiguadora de fosfato de sodio- cloruro de sodio de pH 7. La sílica lavada fue contactada en una solución amortiguadora de carbonato

52

16

de sodio de pH 9.6 por aproximadamente 2 horas y de este modo desorber el antígeno de superficie. Entonces, el antígeno de superficie separado tuvo una pureza de proteína por encima del 90% en la solución. La solución resultante fue fluida en la DEAE-Sefarosa (PHARMACIA; Suecia) que fue balanceada empleando dicha solución amortiguadora de sodio, y de este modo unir de manera específica un antígeno de superficie y retirar las sustancias separadas en la columna empleando dicha solución. Los contaminantes ligeramente unidos sobre la columna fueron eluidos empleando la solución amortiguadora que incluye cloruro de sodio de 0.05~0.1M. Después, el antígeno de superficie de la hepatitis B fue eluido empleando dicha solución amortiguadora que incluye cloruro de sodio de 0.2M. Entonces, la solución eluida fue concentrada empleando una membrana de ultrafiltración, que es capaz de separar las sustancias de peso molecular por encima de 100,000, y el precipitado fue separado por centrifugación y retirado, y la solución superior fue recolectada, y se realizó cromatografía de impregnación de gel (Sefarosa CL-4B, PHARMACIA, Suecia) con respecto a la solución superior recolectada. Las fracciones que incluyen un antígeno de superficie puro, fueron confirmadas por electroforesis y fueron empleadas como antígeno de la hepatitis B. Adicionalmente, con el fin de disminuir una interacción con cada uno de los antígenos de superficie de la hepatitis, se adicionó tween 80 a 0, 5, 10µg por 1ml, y luego se observó el efecto del tween 80 (como se muestra en la Fig. 2).

Ejemplo 2

Fabricación del toxoide de difteria

La bacteria corynebacterium PW No. 8 fue cultivada a 35°C por 24 horas en el medio de cultivo nutrido con agar (DIFCO, USA) y fue subcultivado dos veces. Una de las colonias fue cultivada a 35°C por 24 horas en 2 ml de medio de cultivo de infusión de corazón cerebro

(DIFCO, USA), y 1.2ml de éste fue inoculado a 300ml de medio de cultivo Muller modificado (Referirse a: Stainer, y otros, Canadian J. Microbiol., 14:155, 1968), y fue cultivado a 35°C

por 36 horas. Después del cultivo, las células fueron retiradas de la solución de cultivo, y la solución de toxina fue recolectada y fue adicionada con sulfato de amonio a 4°C. La concentración final fue hecha en 25% (p/v), y el pH fue ajustado en 8.0. La solución de cultivo que tiene el pH ajustado y la concentración de sal fue adicionada gota a gota en una columna de fenil-sefarosa la cual fue previamente balanceada empleando solución amortiguadora Tris 10mM de pH 8.0 que incluye 25%(p/v) de sulfato de amonio. La solución amortiguadora igual a la de la solución de balance de la columna y solución amortiguadora Tris 10mM (pH 8.0) que incluye 15% (p/v) de sulfato de amonio, fue fluida de manera secuencial a la columna, para de este modo retirar impurezas. La toxina fue eluida empleando solución amortiguadora Tris 10mM (pH 8.0) que no incluye sal. La solución eluida de toxina de difteria fue recolectada y dializada a solución amortiguadora de fosfato 10 mM (pH 7.4) que incluye cloruro de sodio de 150mM. Después de que el proceso de diálisis se completó, se adicionó formalina, para que la concentración final fuera 0.05% (p/v), y la solución resultante fue reaccionada a 37°C por 1 hora, y se adicionó lisina para de este modo obtener la concentración final de 0.05M y luego, la solución resultante fue destoxificada a 37°C por 4 semanas. La solución de toxoide fue dializada en solución amortiguadora de fosfato 10mM (pH 7.4) con cloruro de sodio para de este modo remover completamente la formalina, y fue adicionado timerosal para tener una concentración final de 0.01% (p/v). La solución resultante fue empleada como solución de toxoide de difteria.

Ejemplo 3

Fabricación del toxoide del tétano

El *Clostridium tetanii* (Cepa Harvard) fue cultivado mediante el método de agar fundido con medio de agar de bilis de hígado esterilizado (DIFCO, USA). Unas colonias del cultivo anterior fueron inoculadas dentro del medio de cultivo de infusión de corazón cerebro (DIFCO, USA) que incluye 2ml de extracción de levadura 0.3% (p/v) (DIFCO, USA) que tiene el nivel de oxígeno disminuido, y fueron cultivadas a 35°C por 24 horas en estado anaeróbico. Y luego, la solución de cultivo fue inoculada dentro de 500ml de un medio de cultivo de infusión de corazón cerebro completamente saturado de nitrógeno (DIFCO, USA) que incluye 0.3% (p/v) de extracción de levadura (DIFCO, USA) y fueron cultivadas a 35°C por 7 días en estado anaeróbico. Después del cultivo, las células fueron retiradas de la solución de cultivo, la solución de toxina fue recolectada y adicionada con sulfato de amonio a 4°C para de este modo obtener la concentración final de 60% (p/v) y fue mezclada por más de 24 horas y fue completamente mezclada para de este modo obtener un precipitado por centrifugación. El precipitado fue disuelto en una pequeña cantidad de agua destilada, y el material insoluble fue retirado. La solución resultante fue adicionada gota a gota en una columna de sefagril S-100 la cual fue previamente balanceada empleando solución amortiguadora Tris 10mM (pH 8.0) que incluye cloruro de sodio 0.5M. La misma solución amortiguadora fue fluida para de este modo eluir la toxina separada. La solución de toxina de tétano fue recolectada y dializada en una solución amortiguadora de fosfato 10mM (pH 7.4) que incluye cloruro de sodio 150mM. Después de la diálisis fue adicionada formalina para tener una concentración final de 0.025% (p/v) y fue reaccionada a 37°C por 1 hora. Después, fueron adicionados lisina y carbonato hidrógeno de sodio para tener una concentración final de 0.05mM y 0.04M, respectivamente, y fue madurado a 37°C por 4 semanas y fue destoxificada. Luego de la destoxificación, la solución de toxoide fue dializada en solución amortiguadora de fosfato 10mM (pH 7.4) que incluye cloruro de sodio 150 mM, y la formalina fue completamente retirada. Fue adicionado timerosal para tener una concentración final de 0.01% (p/v) y fue empleada como solución de toxoide de tétano.

85
55

19

Ejemplo 4

Fabricación de la proteína antígeno purificada de tos ferina

5

Bordetella pertussis, Tohama fase I fue cultivado en medio de cultivo de agar Bodet-Gengo (DIFCO, USA) que incluye sangre de conejo al 15% a 35°C por 72 horas y fue pasada dos veces. Unas colonias fueron inoculadas dentro de 50ml de medio de cultivo de stanor-sholte y fue cultivado a 35°C por 48 horas. La solución cultivada resultante fue re-inoculada en 500 ml de medio de cultivo de stanor-sholte cambiado (referirse a Imazumi y otros, INFECTION IMMUN., 1983, vol 41, pp. 1138) y fue cultivado a 35°C por 36 horas. A la solución de cultivo se adicionó una solución acuosa de timerosal al 10% para tener una concentración final de 0.01%, para de este modo prevenir el crecimiento de la bacteria de tos ferina, y luego las células fueron retiradas por centrifugación. Se adicionó tres veces el volumen de agua destilada a la solución resultante, y fue bien mezclado. El pH actual fue disminuido a pH 6.0 empleando ácido sulfúrico 1N. La solución resultante fue adicionada gota a gota en una columna de CM-sefarosa la cual fue previamente balanceada empleando solución amortiguadora de fosfato de sodio 10mM de pH 6.0. La solución amortiguadora igual a la solución de balanceo de la columna fue fluida en la columna para de este modo retirar las sustancias que no fueron acopladas a la columna, y las impurezas que fueron ligeramente acopladas a la columna fueron retiradas empleando la misma solución amortiguadora a la solución de balanceo de la columna que incluye cloruro de sodio 100 mM. Cuando las impurezas no fueron mas eluidas a través de la columna, los materiales enlazados fueron eluidos con gradiente lineal formado por solución de balanceo de columna que incluye cloruro de sodio 100mM y cloruro de sodio 600 mM que tienen el mismo volumen, para que fuera separada una fracción que incluye proteína antígeno de tos ferina tal como toxina de tos ferina y FHA (hemaglutinina filamentosa). La fracción de antígeno fue diluida empleando solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM (pH 8.0) de dos veces el volumen para

tener pH 8.0. La solución resultante fue adicionada gota a gota en columna de hidróxi apatita la cual fue previamente balanceada empleando solución amortiguadora de fosfato de sodio 10mM de pH 8.0. La solución amortiguadora igual a la solución de balanceo de columna que
5 incluye cloruro de sodio 100 mM fue fluida en la columna para de este modo retirar las sustancias que no fueron acopladas a la columna. Una solución amortiguadora de fosfato de sodio 80mM de pH 8.0 que incluye 100mM de cloruro de sodio fue fluida a la misma proporción que la proporción de goteo para de este modo separar la fracción de toxina de tos ferina. Cuando la toxina de tos ferina fue separada, una solución amortiguadora de fosfato de
10 sodio 250mM de pH 8.0 que incluye cloruro de sodio 100 mM , fue fluida a la misma proporción que la proporción de goteo para de este modo separar la fracción de FHA (hemaglutinina filamentosa). La toxina de tos ferina y la FHA (hemaglutinina filamentosa) separadas, fueron dializadas a 4°C en solución amortiguadora de fosfato de sodio 10mM (pH 7.4) que incluye cloruro de sodio al 0.15%. Se adicionaron glicerol y glutaraldehído a la
15 solución muestra de toxina de Tos ferina dializada para tener la concentración final de 50% (p/v) y 0.05% (p/v) y fueron destoxificadas a 37°C por 4 horas. Se adicionó aspartato de sodio para tener una concentración final de 0.025 M para de este modo completar el proceso de destoxificación. Se adicionaron glicerol y formalina a la muestra de solución de FHA (hemaglutinina filamentosa) dializada, para tener 50%(p/v) y 0.025% (p/v) y fueron
20 destoxificadas a 37°C por 24 horas. Se adicionó lisina para tener una concentración final de 0.025 M, para que el proceso de destoxificación fuera completo. Cada solución muestra fue dializada en solución amortiguadora de fosfato de sodio 10mM (pH 7.4) que incluye cloruro de sodio 0.15% a temperatura ambiente. Se adicionó timerosal para tener una concentración final de 0.01 % (p/v). Después la solución muestra de toxina de tos ferina destoxificada y la
25 solución muestra de FHA (hemaglutinina filamentosa) fueron mezcladas a una proporción de 1:4 y fueron empleadas como una proteína antígeno de tos ferina.

Ejemplo 5

87
5x

2x

Fabricación de un antígeno de célula completa de tos ferina

5 La bacteria de tos ferina, *Bordetella Pertussis*, *Tohama* fase I fue cultivada en medio de cultivo agar Bodet-Gengo (DIFCO, USA) que incluye sangre de conejo al 15% a 35°C por 72 horas y fue pasada dos veces. Algunas de las colonias fueron inoculadas en 50 ml de medio de cultivo Stanor-sholte y fueron cultivadas a 35°C por 48 horas. La solución resultante fue re-inoculada en 500ml de medio de cultivo stanor-sholte cambiado (referirse a Imazumi y otros, INFECT.-IMMUN., 1983, vol 41, pp 1138) y fueron cultivados a 35°C por 36 horas. Se
10 adicionó una solución acuosa de timerosal al 10% en la solución de cultivo para tener una concentración final de 0.01% y de este modo prevenir el crecimiento de la bacteria de tos ferina y recolectar el somático basado en la centrifugación. La solución somática recolectada fue dializada en solución amortiguadora de fosfato de sodio 10mM (pH 7.4) que incluye cloruro de sodio al 0.15% a 4°C. Se adicionó formalina en la solución somática de tos ferina
15 dializada para tener la concentración final de 0.025% (p/v) y fue destoxificada a 37°C por 4 semanas. Se adicionó lisina para tener la concentración final de 0.025M y de este modo completar el proceso de destoxificación. La solución muestra fue dializada en solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.4) que incluye cloruro de sodio al 0.15%, y fue adicionado timerosal para tener la concentración final de 0.01% (p/v) y fue empleado
20 como el antígeno de célula completa de tos ferina.

Ejemplo 6

Fabricación de la vacuna combinada que incluye antígeno de tos ferina purificado

25

Etapas 1. Fabricación de la vacuna de hepatitis B

La vacuna de hepatitis B fue fabricada empleando el antígeno de superficie de hepatitis B fabricado en el ejemplo 1. La solución de hidróxido de aluminio fue fabricada por adición de gel de hidróxido de aluminio a la solución amortiguadora de fosfato. La solución resultante fue lentamente mezclada, y la solución del antígeno anterior fue adicionada gota a gota y mezclada por agitación de manera lenta a 4°C por 15 horas, y de este modo fabricar la vacuna de hepatitis B. En este momento, la cantidad del antígeno de superficie de hepatitis fue 60µg/ml que fue de tres veces más concentrado en comparación con la cantidad del antígeno de superficie de hepatitis B común. En el caso de la primera muestra, la cantidad del ión aluminio en el gel de hidróxido de aluminio fue de 0.9mg/ml. En el caso de la segunda muestra, la cantidad del ión aluminio en el gel de hidróxido de aluminio fue de 1.5 mg/ml (como se muestra en la Fig. 2).

Etapas 2. Fabricación de la vacuna combinada DTP

La vacuna combinada DTP fue fabricada empleando cada antígeno fabricado en el segundo, tercero y cuarto ejemplos. La solución de hidróxido de aluminio fue fabricada por adición del gel de hidróxido de aluminio a la solución amortiguadora de fosfato en el método convencional. Como la solución resultante fue mezclada lentamente, cada solución de antígeno fue adicionada gota a gota ahí mismo y fue mezclado por agitación de manera lenta y de este modo implementar una adsorción uniforme, para que la vacuna combinada DTP fuera fabricada. En este momento, la cantidad de cada antígeno fue 1.5 veces más concentrada, comparado con la cantidad del antígeno componente de la vacuna DTP común. La cantidad del ión aluminio en el gel de hidróxido de aluminio fue de 0.3mg/ml.

Etapas 3. Fabricación de la vacuna combinada de DTP-hepatitis B

Cada vacuna DTP y vacuna hepatitis B fabricada en las etapas 1 y 2, fueron mezcladas lentamente a una proporción de volumen de 2:1. En el caso de la primera muestra, se adicionó exceso de gel de hidróxido de aluminio para que la cantidad del ión aluminio en el gel de hidróxido de aluminio fuera finalmente de 0.7mg/ml, y fue continuamente mezclada por agitación a 25°C por 1 hora para de este modo fabricar una vacuna combinada estable que no interactué con otros componentes. En el caso de la segunda muestra, no se adicionó exceso de gel de hidróxido de aluminio y fue continuamente mezclado por agitación a 25°C por 1 hora para de este modo fabricar la vacuna combinada. Las cantidades de iones aluminio en el gel de hidróxido de aluminio de las vacunas combinadas de la primera y segunda muestras fueron de 0.7mg/ml. Para la prueba de título de anticuerpo, la composición de la vacuna combinada fue de 20µg del antígeno de superficie de hepatitis B, 25Lf de Toxoide de difteria, 3Lf de Toxoide de tétano, 2.5µgPN de Toxoide de tos ferina, y 10µgPN de antígeno FHA de tos ferina (antígeno FHA de tos ferina (hemaglutinina filamentosa) basado en 1 ml (como se muestra en la Fig. 2).

Ejemplo 7

Fabricación de la vacuna combinada que incluye antígeno de célula completa de tos ferina

Etapas 1. Fabricación de la vacuna de hepatitis B

La vacuna de hepatitis B fue fabricada empleando el antígeno de superficie de hepatitis B fabricado en el Ejemplo 1. Un gel de hidróxido de aluminio fue adicionado a la solución amortiguadora de fosfato para de este modo fabricar la solución de hidróxido de aluminio. Como la solución fue mezclada lentamente, la solución de antígeno anterior fue adicionada gota a gota y fue mezclada completamente a 4°C por 15 horas, para de este modo fabricar la

vacuna de hepatitis B. En este momento, la cantidad de antígeno de superficie de hepatitis B fue 60µg/ml que fue tres veces más concentrado, comparado con la cantidad de la vacuna común de hepatitis B. En el caso de la primera muestra, la cantidad del ión aluminio fue de 0.9mg/ml en el gel de hidróxido de aluminio. En el caso de la segunda muestra, la cantidad del ión aluminio fue de 1.5mg/ml en el gel de hidróxido de aluminio (como se muestra en la Fig. 2).

Etapas 2. Fabricación de la vacuna combinada DTP

La vacuna combinada DTP fue fabricada empleando cada antígeno fabricado en los ejemplos 2, 3 y 5. El gel de hidróxido de aluminio fue adicionado a la solución amortiguadora de fosfato en el método convencional para fabricar de este modo una solución de hidróxido de aluminio. Como la solución resultante fue mezclada lentamente, la solución de antígeno anterior fue adicionada gota a gota y fue mezclado completamente. Una adsorción uniforme fue implementada para fabricar de este modo una vacuna combinada DTP. En este momento, la cantidad de cada antígeno fue 1.5 veces más concentrada, comparado con la cantidad de cada antígeno componente de la vacuna DTP común. La cantidad del ión aluminio fue de 0.3mg/ml en el gel de hidróxido de aluminio.

Etapas 3. Fabricación de la vacuna combinada de DTP-hepatitis B

Cada vacuna DTP y vacuna hepatitis B fabricadas en las etapas 1 y 2, fueron mezcladas lentamente a una proporción de volumen de 2:1. En el caso de la primera muestra, fue adicionado un exceso de gel de hidróxido de aluminio para que la cantidad del ión aluminio en el gel de hidróxido de aluminio fuera finalmente de 0.7mg/ml, y la solución resultante fue continuamente mezclada a 25°C por 1 hora, y de este modo fabricar una vacuna combinada

estable que no interactúe con otros componentes. En el caso de la segunda muestra, no fue adicionado exceso de gel de hidróxido de aluminio y la solución fue continuamente mezclada a 25°C por 1 hora, y de este modo fabricar la vacuna combinada. Las cantidades de los iones aluminio en el gel de hidróxido de aluminio de las vacunas combinadas de las muestras 1 y 2, fueron de 0.7 mg/ml. Para la prueba de título de anticuerpo, la composición de la vacuna combinada fue de 20µg del antígeno de superficie de hepatitis B, 50Lf de Toxoide de difteria, 10Lf de Toxoide de tétano, y 20 OE de un antígeno de célula completa de tos ferina, basado en 1 ml (como se muestra en la Fig. 2).

Ejemplo 8.

Prueba de antigenicidad en la vacuna combinada

La prueba de antigenicidad en la vacuna combinada fabricada por los ejemplos 6 y 7 fue realizada por el Ensayo de Inmuno Enzima (EIA), empleando anticuerpo monoclonal y anticuerpo policlonal por comparación al estándar de cada antígeno con respecto al contenido de antígeno.

Adicionalmente, el antígeno adsorbido a la sal de aluminio fue retirado mediante centrifugación por medición de la proporción de adsorción de cada antígeno, y la cantidad del antígeno separado fue medida empleando la solución superior.

El promedio de cada resultado se muestra en las Figs. 1 y 2 las cuales indican la antigenicidad relativa de cada antígeno.

Ejemplo 9.

62
62

26

Prueba de formación de anticuerpos por la vacuna combinada

Prueba de formación de anticuerpos por el antígeno de superficie de hepatitis B

5

La vacuna combinada y la vacuna de hepatitis B fabricadas en los Ejemplo 6 y 7 fueron inoculadas en ratones ICR, en donde 16 ratones fueron agrupados como el grupo 1, y se recolectó sangre de los ratones ICR después de 18 días. El suero fue separado de la sangre. El nivel de anticuerpos contra el antígeno de superficie de hepatitis B fue obtenido basado en la unidad de IU/ml empleando el EIA (Ensayo de Inmuno Enzima) y calculado como en media geométrica de título de anticuerpos. El título de la vacuna combinada fue calculado con respecto a la vacuna de la hepatitis B.

10

Las Figs. 2c y 2d muestran el título de anticuerpos relativo de la vacuna combinada con respecto a cada antígeno y la Tabla 1 muestra los valores de cada título.

15

Prueba de formación de anticuerpos por el antígeno de difteria

La vacuna combinada y la vacuna DTP fabricadas en los Ejemplos 6 y 7 fueron inoculadas en los ratones ICR en donde 16 ratones son agrupados como el grupo 1. Se recolectó sangre de los ratones ICR después de 28 días. El suero fue separado de la sangre. El nivel de anticuerpos contra el antígeno de difteria del suero, fue medido empleando el EIA (Ensayo de Inmuno Enzima) basado en la unidad de IU/ml y calculado como en media geométrica de título de anticuerpos. Después, el título de la vacuna combinada fue medido en comparación con la vacuna DTP.

20

25

Las Figs. 2c y 2d muestran el título de anticuerpos relativo de la vacuna combinada con respecto a cada antígeno y la Tabla 1 muestra los valores de cada título.

63
21

Prueba de formación de anticuerpos por el antígeno del tétano

5 La vacuna combinada y la vacuna DTP fabricadas en los Ejemplos 6 y 7 fueron inoculadas en ratones ICR, en donde 16 ratones fueron agrupados como el grupo 1, la sangre fue recolectada de los ratones ICR después de 28 días. El suero fue separado de la sangre. El nivel de anticuerpos contra el antígeno del tétano del suero fue medido empleando el EIA (Ensayo de Inmuno Enzima) basado en la unidad de IU/ml y calculado como en media geométrica de título de anticuerpos. Después, el título de la vacuna combinada fue medido
10 en comparación con la vacuna DTP.

Las Figs. 2c y 2d muestran el título de anticuerpos relativo de la vacuna combinada con respecto a cada antígeno y la Tabla 1 muestra los valores de cada título.

15 **Prueba de formación de anticuerpos por el antígeno de tos ferina**

La vacuna combinada y la vacuna DTP fabricadas en los Ejemplos 6 y 7 fueron inoculadas en los ratones ICR, en donde 16 ratones fueron agrupados como el grupo 1. La sangre fue recolectada de los ratones ICR después de 28 días. El suero fue separado de la sangre. El
20 nivel de anticuerpos contra el antígeno de tos ferina del suero fue medido empleando el EIA (Ensayo de Inmuno Enzima) basado en la unidad de IU/ml y como en media geométrica de título de anticuerpos. Después, el título de la vacuna combinada fue medido en comparación con la vacuna DTP.

25 Las Fig. 2c y 2d muestran el título de anticuerpos relativo de la vacuna combinada con respecto a cada antígeno y la Tabla 1 muestra los valores de cada título.

64
64

28

Tabla 1

	Vacuna DTwP (Fosfato de aluminio como un adsorbente)	Vacuna DTwP (Hidróxido de aluminio como un adsorbente)	Vacuna combinada DTwP–HepB (Muestra A)	Vacuna combinada DTwP–HepB (Muestra B)	Criterio de título
Difteria Potencia (IU/ml)	>800	249.7	601.1	128.1	Por encima de 30 IU/ml
Tétano Potencia (IU/ml)	176.5	198.0	216.9	230.7	Por encima de 40 IU/ml
Tos ferina Potencia (IPU/ml)	20.2	3.2	25.4	5.5	Por encima de 8 IPU/ml
Hepatitis B Potencia Relativa (%)	-	-	196.8	103.9	Igual o por encima del valor de la muestra estándar

5 Ejemplo 10.

Prueba de efectividad comparativa con monos

Una prueba fue realizada para probar la Inmunogenicidad en un primate de la vacuna combinada y en comparación con la vacuna individual convencional. La vacuna combinada fabricada en el Ejemplo 6 fue administrada a seis monos (grupo 2) formado por el mismo número de monos machos y hembras, y cada vacuna componente fue administrada a 6 monos (grupo 1) formado por el mismo número de monos machos y hembras simultáneamente. Los mismos productos como los productos vacunados a cada grupo fueron re-vacunados al 30^{avo} y 60^{avo} días. La sangre fue recolectada de cada animal experimental en el 1^{ro}, 28^{avo}, 58^{avo}, y 86^{avo} días a partir de la fecha de vacunación inicial, y el título de anticuerpos contra la

enfermedad fue medido con base en el método apropiado de ELISA respecto del suero del mono.

- 5 La Fig. 3 muestra la media geométrica del título de anticuerpos contra cada antígeno de cada grupo.

APLICACIÓN INDUSTRIAL

- 10 De acuerdo con la presente invención, está dirigido a un método para fabricar una vacuna combinada para prevenir simultáneamente enfermedades tales como difteria, tétano, tos ferina, y hepatitis B, etc. que deben ser prevenidas en un infante. Mediante la presente invención, es posible prevenir simultáneamente enfermedades tales como difteria, tétano, tos ferina, y hepatitis B que deben ser prevenidas en un infante, empleando la vacuna
15 combinada de acuerdo con la presente invención.

- Como la presente invención puede ser realizada en varias formas sin apartarse del espíritu o las características esenciales de la misma, también debe ser entendido que las realizaciones anteriormente descritas no se limitan por ninguno de los detalles de la presente descripción,
20 a menos que se especifique lo contrario, sino que se deben interpretar de manera amplia dentro de su esencia y alcance como se define en las reivindicaciones anexas, y por lo tanto se pretende que todos los cambios y modificaciones que caen dentro de los términos y límites de las reivindicaciones, o equivalencias de tales términos y límites, sean acogidos por las reivindicaciones anexas.

66
66

20

REIVINDICACIONES

1. Un método de fabricación de una vacuna combinada, que comprende las etapas de:
la etapa de adsorción de adsorber de manera independiente cada antígeno protector a un
5 adsorbente respectivamente con respecto a varias enfermedades; y
la etapa de combinación de mezclar cada antígeno protector mencionado adsorbido al
adsorbente.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el antígeno protector es el antígeno
10 seleccionado del grupo que comprende el antígeno de difteria, el antígeno del tétano, el
antígeno de tos ferina, el antígeno de la hepatitis B, o dos o más combinaciones de los
mismos.

3. El método de la reivindicación 1, en donde el adsorbente es gel de hidróxido de
15 aluminio.

4. El método de la reivindicación 3, en donde la concentración del ión aluminio del gel
de hidróxido de aluminio después de la fabricación de una vacuna combinada, está en el
rango de 0.5~1.25mg/ml.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, que comprende además una
etapa de:
adición del adsorbente en el cual la concentración final de ión aluminio no excede en el
rango de 0.5~1.25mg/ml en el gel de hidróxido de aluminio.

67
68

21

6. El método de la reivindicación 2, en donde un antígeno de superficie de hepatitis B recombinante como el antígeno de hepatitis B, es combinado por la cantidad de 5~10 μ g, basado en la dosis pediátrica.

5

7. El método de la reivindicación 6, que comprende además una etapa de: adición de un surfactante neutro tal como polisorbato 20, polisorbato 80 y tritón X-100.

10

8. El método de la reivindicación 6, en donde dicho antígeno de hepatitis B es mezclado mediante agitación con un adsorbente a 2~8°C por 3~20 horas y es madurado y adsorbido.

15

9. El método de la reivindicación 2, en donde el toxoide de difteria destoxificado como un antígeno de difteria, es combinado por la cantidad de 10~25Lf basado en la dosis pediátrica.

10. El método de la reivindicación 2, en donde el toxoide de tétano destoxificado como un antígeno de tétano, es combinado por la cantidad de 1~5Lf basado en la dosis pediátrica.

20

11. El método de la reivindicación 2, en donde el antígeno de tos ferina que incluye los antígenos purificados, está combinado por la cantidad por debajo de 20 μ gPN basado en la dosis pediátrica o el antígeno de célula completa de tos ferina está combinado por la cantidad por debajo de 20 OE basado en la dosis pediátrica.

25

12. El método de la reivindicación 11, en donde los antígenos purificados de tos ferina mencionados, Incluyen toxoide de tos ferina y tos ferina FHA (hemaglutinina filamentosa).

13.

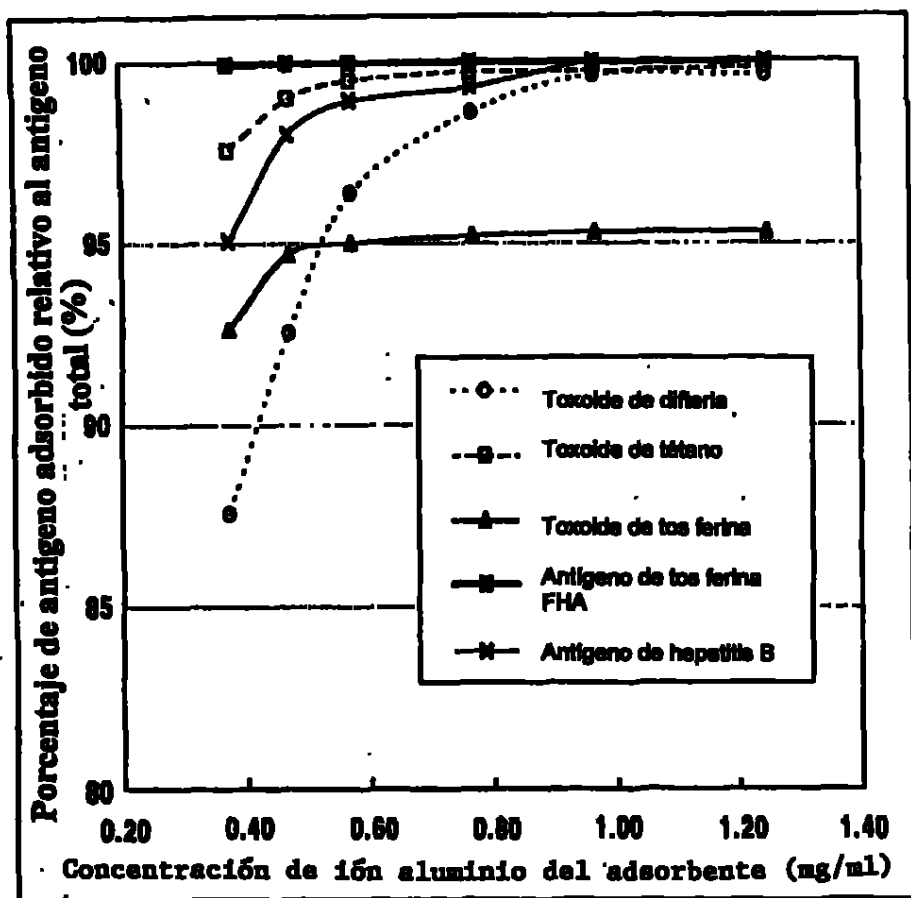
68
68

32

13. Una vacuna combinada tal y como se produce de acuerdo con cualquiera de los métodos reivindicados en las reivindicaciones 1 a 12.

1/5

Fig. 1



2/5

Fig. 2a

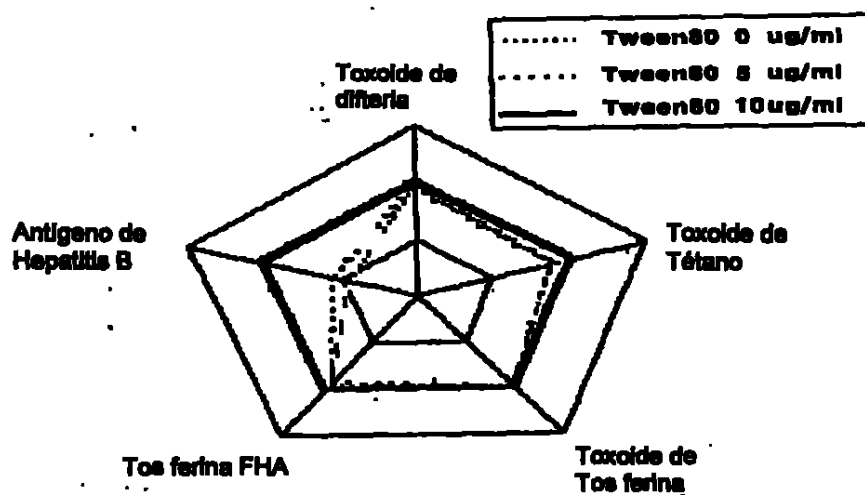
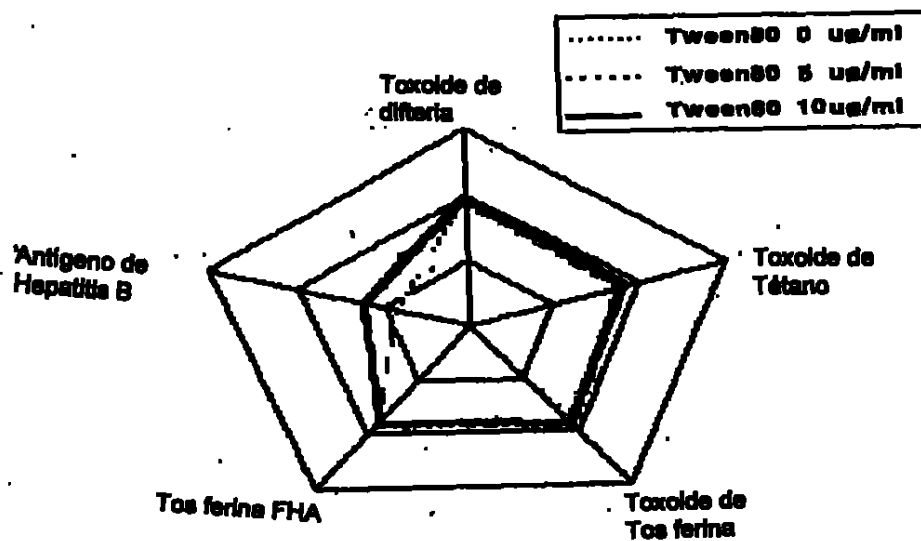


Fig. 2b



71
71

3/5

Fig. 2c

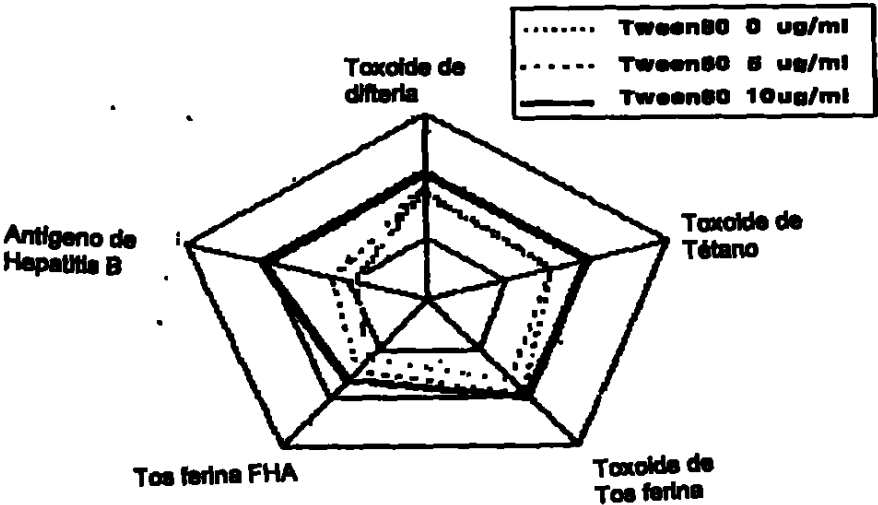
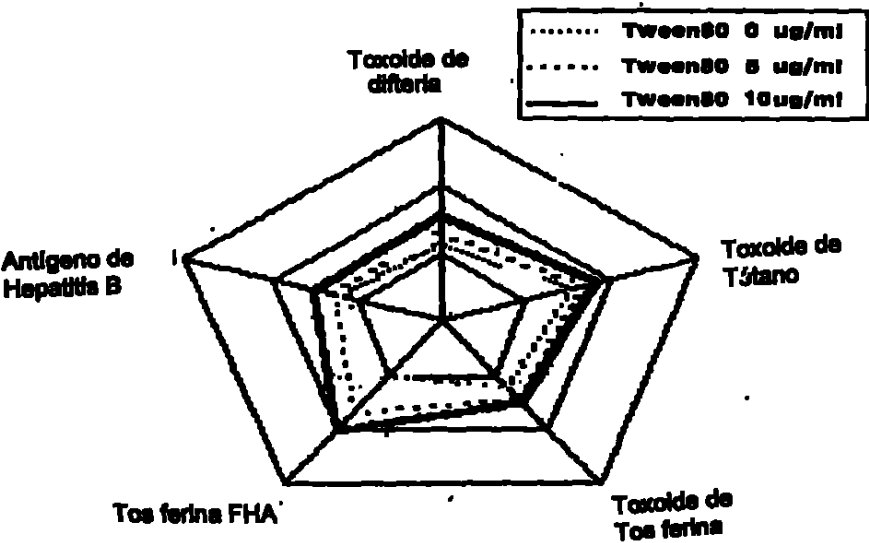


Fig. 2d



72
72

4/5

Fig. 3a

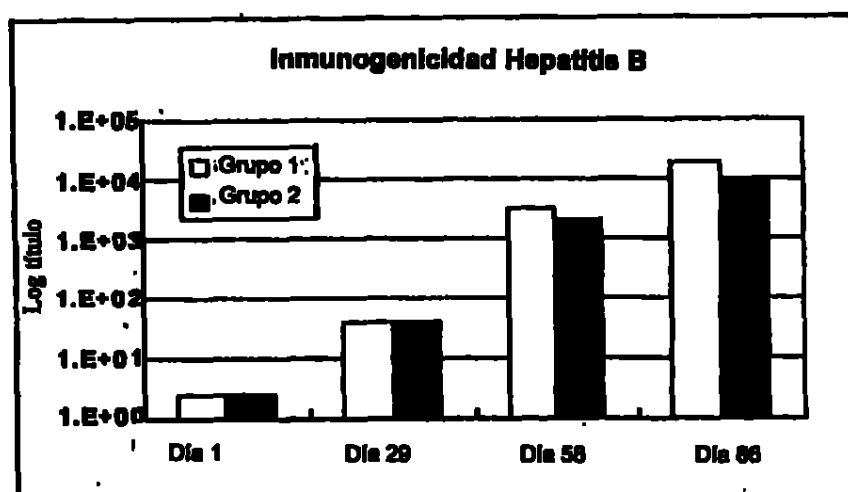
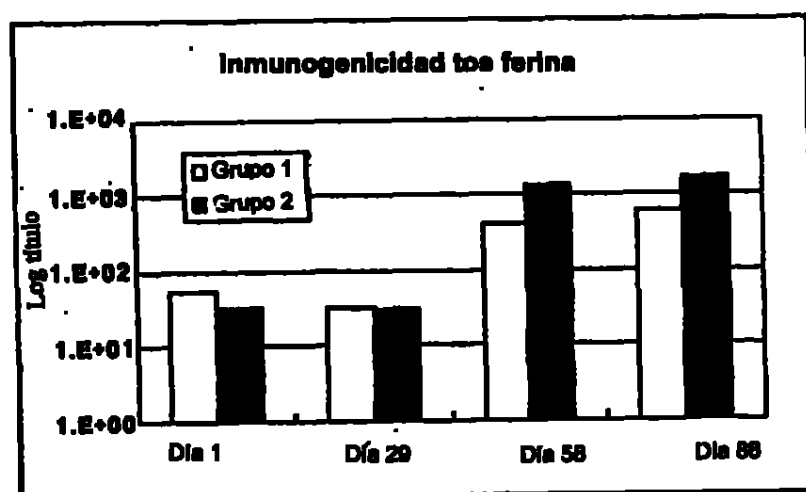


Fig. 3b



73

5/5

Fig. 3c

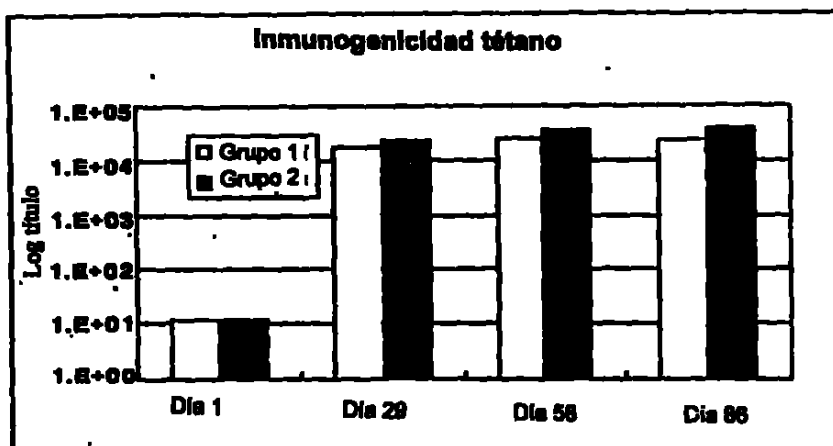
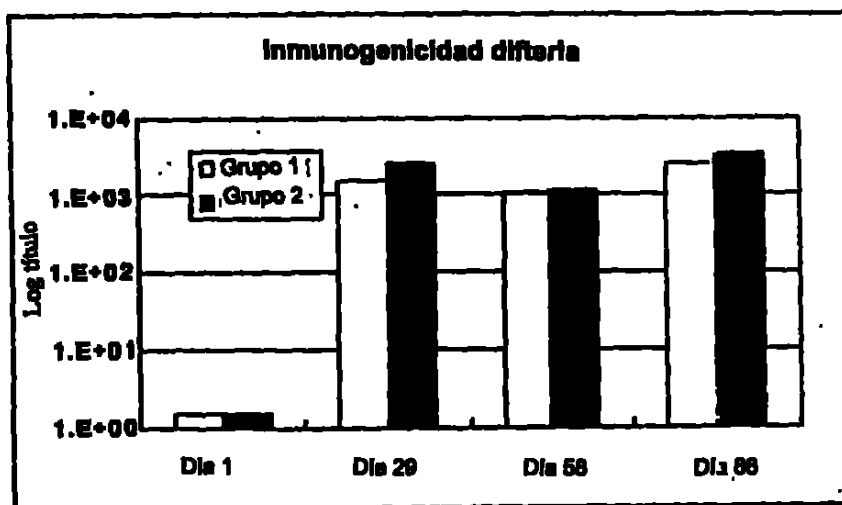


Fig. 3d



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference NK-0258	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/KR02/00034	International filing date (day/month/year) 09 JANUARY 2002 (09.01.2002)	Priority date (day/month/year) 10 JANUARY 2001 (10.01.2001)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC7 A61K 39/29		
Applicant LG CHEM INVESTMENT, LTD. et al		

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 <u>3</u> 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 _____ 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 09 JULY 2002 (09.07.2002)	Date of completion of this report 16 MAY 2003 (16.05.2003)
Name and mailing address of the IPEA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer HAN, Hyung Mee Telephone No. 82-42-481-5601 

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/KR02/00034

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement) under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

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 international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 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. _____
- ☐ the drawings, sheet _____

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, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

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

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under Item I and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

International application No.

PCT/KR02/00034

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)	Claims	1-13	YES
	Claims	None	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-13	YES
	Claims	None	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13	YES
	Claims	None	NO

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

The present invention relates to a method for manufacturing a combined vaccine capable of concurrently preventing multiple diseases such as diphtheria, tetanus, pertussis and hepatitis B, and a combined vaccine prepared thereof. The method for manufacturing a combined vaccine according to the present invention includes the steps of independently adsorbing each protective antigen to an adsorbent of aluminum hydroxide gel with respect to various diseases such as diphtheria, tetanus, pertussis and hepatitis B, and combining each protective antigen after the adsorption procedure.

The following documents have been considered for the purpose of this report:

D1 = WO 93/24148 (09 December 1993)

D2 = WO 99/13906 (25 March 1999)

1. Novelty and Inventive Step

D1 discloses a combined vaccine comprising hepatitis B surface antigen adsorbed to aluminum phosphate or aluminum hydroxide and other antigens such as diphtheria, tetanus, pertussis, inactivated polio, Haemophilus influenzae b (Hib) and hepatitis A. D2 describes a multi-valent immunogenic composition preventing multiple diseases such as diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B, Haemophilus influenzae and poliovirus. The method for manufacturing a combined vaccine including the steps of independently adsorbing each protective antigen to the adsorbent and combining each antigen after the adsorption procedure is not described in any of the prior art. Therefore, the subject-matter of claims 1-13 is considered to be novel and to involve an inventive step under PCT Article 33(2) and 33(3).

2. Industrial Applicability

The subject-matter of claims 1-13 is considered to be industrially applicable under PCT Article 33(4).

77
77

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

INFORME DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(Artículo 36 y Regla 70 del PCT)

(Reporte fundamentado de acuerdo a la Notificación del Presidente de la EPO publicada en la OJ11/2001)

Archivo de referencia del solicitante o del agente NK-0258	PARA ACCION POSTERIOR	Ver Notificación de Transmisión del Informe del Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA/416)
Solicitud Internacional No. PCT/KR02/00034	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 09/01/02	Fecha de prioridad (día/mes/año) 10/01/01
Clasificación Internacional de Patente (CIP) o Clasificación Nacional y CIP IPC7 A61K 39/29		
Solicitante: LG CHEM INVESTMENT, LTD. ET AL		
1 Este Informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de acuerdo con el Artículo 36. 2 Este INFORME consiste en un total de <u>3</u> hojas, incluyendo esta carátula. ☐ Este Informe también se acompaña de los ANEXOS, esto es, hojas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este Informe y/o hojas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas según el PCT Estos anexos consisten en un total de <u> </u> hojas.		
3 Este Informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: I ☒ Base del Informe II ☐ Prioridad III ☐ No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación Industrial IV ☐ Carencia de unidad de la invención V ☒ Declaración razonada según artículo 35(2) con relación a la novedad, nivel inventivo o aplicación Industrial; citas y explicaciones que apoyan tal declaración VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional		

Fecha de presentación de la solicitud de examen 09/07/02	Fecha de completamiento de este Informe 16/06/03
Nombre y dirección de correo del IPEA/KR Oficina de la Propiedad Intelectual Koreana 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, KOREA Fax No. 82-42-472-7140	Funcionario autorizado HAN, Hyung Mee Teléfono No. 81-42-481-5601

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud internacional No.
PCT/KR02/00034

I. Base del Informe

1 Con relación a los elementos de la solicitud internacional:*

- ☒ la solicitud internacional como se presentó originalmente
- ☐ la descripción:
páginas _____ como se presentaron originalmente
páginas _____ presentadas con la demanda
páginas _____, presentadas con la carta de
- ☐ las reivindicaciones:
páginas _____ como se presentaron originalmente
páginas _____ presentadas con la demanda
páginas _____, presentadas con la carta de
- ☐ los dibujos:
páginas _____ como se presentaron originalmente
páginas _____ presentadas con la demanda
páginas _____, presentadas con la carta de
- ☐ la secuencia de la lista de partes de la descripción:
páginas _____ como se presentaron originalmente
páginas _____ presentadas con la demanda
páginas _____, presentadas con la carta de

2 Con relación al idioma, todos los elementos antes marcados se pusieron a disposición y se suministraron a esta autoridad en el idioma en el que se presentó la solicitud internacional, a menos que se indique de otra forma en este punto.

Estos elementos se pusieron a disposición o se suministraron a esta autoridad en el siguiente idioma el cual es:

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

3 Con relación a cualquier nucleótido y/o secuencia amino ácida descubierta en la solicitud internacional, el examen preliminar internacional se llevó a cabo con base en la lista de secuencia:

- ☐ contenida en la solicitud internacional en forma escrita
- ☐ presentado junto con la solicitud internacional en forma legible en computador
- ☐ suministrado con posterioridad a esta autoridad en forma escrita
- ☐ suministrado luego a esta autoridad en forma legible en computador
- ☐ la declaración que el listado de secuencia escrito suministrado posteriormente no va más allá del descubrimiento en la solicitud internacional que se presentó ha sido suministrada
- ☐ la declaración que la información grabada en forma legible en computador es idéntica a la lista de secuencia escrita ha sido suministrada

4 ☐ Las reformas han dado como resultado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.

5 ☐ Este informe ha sido establecido como si (parte de) las reformas no han sido hechas, ya que se consideran que han ido más allá del descubrimiento que fue presentado, como se indica en la casilla suplementaria (Regla 70.2 (c)).*

* Las hojas de reemplazo que se han suministrado a la Oficina de Recepción en respuesta a una invitación según el artículo 14, se denominan en este informe como "presentadas originalmente".

79
79

INF RME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/KR02/00034

V. Declaración razonada bajo el artículo 35(2) con relación a la novedad, altura inventiva o aplicación Industrial; citas y explicaciones que apoyan tal declaración.

1 Declaración			
Novedad (N)	Reivindicaciones	1-13	Si
	Reivindicaciones	NINGUNA	No
Altura Inventiva (IS)	Reivindicaciones	1-13	Si
	Reivindicaciones	NINGUNA	No
Aplicación Industrial (IA)	Reivindicaciones	1-13	Si
	Reivindicaciones	NINGUNA	No

2 Citas y explicaciones

La presente invención se relaciona con un método para la fabricación de una vacuna combinada, capaz de prevenir actualmente varias enfermedades tales como difteria, tétano, tos ferina y hepatitis B, y una vacuna combinada preparada de este. El método para fabricar una vacuna combinada de acuerdo a la presente invención incluye los pasos de adsorber independientemente cada antígeno protector a una adsorbente gel de hidróxido de aluminio con respecto a varias enfermedades tales como difteria, tétano, tos ferina y hepatitis B, y combinar cada antígeno protector después del procedimiento de adsorción.

Los siguientes documentos han sido considerados para el propósito de este informe:
D1= WO 93/24148 (9 de Diciembre de 1993).
D2= WO 99/13908 (25 de Marzo de 1999).

1. Novedad y Nivel Inventivo

D1 revela una vacuna combinada que comprende antígeno de superficie de Hepatitis B adsorbido al fosfato de aluminio ó hidróxido de aluminio y otros antígenos tales como difteria, tos ferina, polio inactivo, influenza b homophilus (Hib) y hepatitis A. D2 describe una composición inmunogénica multivalente que previene múltiples enfermedades tales como difteria, tétano, tos ferina, hepatitis B, Influenza homophilus y poliovirus. El método para fabricar una vacuna combinada incluyendo los pasos de adsorber independientemente cada antígeno protector al adsorbente y combinar cada antígeno después del proceso de adsorción no se describe en ninguno de los documentos de la técnica anterior. Por lo tanto, el contenido de las reivindicaciones 1a 13 se considera que es nuevo y que tiene el nivel inventivo de acuerdo al artículo 33 (2) y 33(3).

2. Aplicación Industrial.

El contenido de las reivindicaciones 1a 13 se considera que tiene una aplicación Industrial de acuerdo al artículo 33(4).

TENT COOPERATION TREATY 89

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

CHO, In-jae
3rd Fl., Janghyun Bldg.
637-23, Yoksam-dong
Gangnam-gu
Seoul 135-909
Republic of Korea

Date of mailing (day/month/year) 07 November 2002 (07.11.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference NK-0258	
International application No. PCT/KR02/00034	International filing date (day/month/year) 09 January 2002 (09.01.02)

1. The following indications appeared on record concerning: ☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative		
Name and Address LG CHEM INVESTMENT, LTD. 20, Yoido-Dong, Youngdungpo-Gu 150-721 Seoul Republic of Korea	State of Nationality KR	State of Residence KR
	Telephone No. +82-42-866-2072	
	Facsimile No. +82-2-557-5558	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: ☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence		
Name and Address LG LIFE SCIENCES LTD. 20, Yeoido-dong, Youngdeungpo-ku 150-721 Seoul Republic of Korea	State of Nationality KR	State of Residence KR
	Telephone No. +82-42-866-2072	
	Facsimile No. +82-2-557-5558	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: ☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned ☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned ☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Nathalie Mansiet Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

81

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

NOTIFICACION DEL REGISTRO DE CAMBIO DE NOMBRE

(PCT regla 92 bis.1 e Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para:
CHO, In-jae
3rd Fl., Janghyun Bldg.
837-23, Yoksam-dong
Gangnam-gu
Seoul 135-909
República de Korea

Fecha de correo (día/mes/año)
Noviembre 7 de 2002 (07.11.02)

Referencia del solicitante
o del agente
NK-0258

NOTIFICACION IMPORTANTE

Número de la solicitud internacional
PCT/KR02/00034

Fecha de presentación internacional (día/mes/año)
9 de Enero de 2002 (09.01.02)

1. La indicación siguiente apareció en el registro concerniente a:

☒ El solicitante ☐ El inventor ☐ El agente ☐ El representante común

Nombre y Dirección
LG CHEM INVESTMENT, LTD
20, Yoido-Dong, Youngdungpo-Gu
150-721 Seoul
República de Korea

Estado de Nacionalidad	Estado de Residencia
KR	KR
Número telefónico	82-42-868-2072
Número de Fax	82-2-557-5558
Número de Teleimpressor	

2. La oficina internacional notifica aquí al solicitante que el cambio siguiente ha sido registrado sobre:

☒ La persona ☐ El nombre ☐ La dirección ☐ La nacionalidad ☐ Residencia

Nombre y Dirección
LG LIFE SCIENCES LTD.
20, Yeoldo-dong, Youngdaungpo-ku
150-721 Seoul
República de Korea

Estado de Nacionalidad	Estado de Residencia
KR	KR
Número de Teléfono	82-42-868-2072
Número de Fax	82-2-557-5558
Número de Teleimpressor	

3. Observaciones adicionales, en caso de ser necesario:

4. Una copia de esta notificación se ha enviado a:

☒ La oficina receptora ☒ Las concernientes oficinas designadas
☐ La autoridad de búsqueda internacional ☐ Las oficinas elegidas concernientes
☐ La autoridad del examen preliminar internacional ☐ Otro

La Oficina Internacional WIPO
34, Chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Fax No. (41-22)740.14.35

Funcionario Autorizado:
Nathalie Manslet
Telefono No. (41-22) 338.83.38

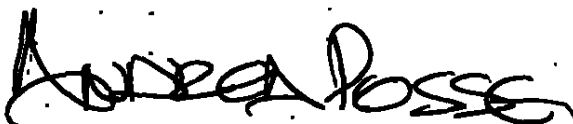
82
82

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 03458225 00000000 Folios: 01
Fecha (AMB): 2003-07-10 14:26:21
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓ MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.		()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.		()
- Descripción de la invención.		()
- Dibujos de ser estos pertinentes.		()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		()
COMPLETA () INCOMPLETA ()		
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()		
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()		

Firma Responsable:



Fecha:

8273

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



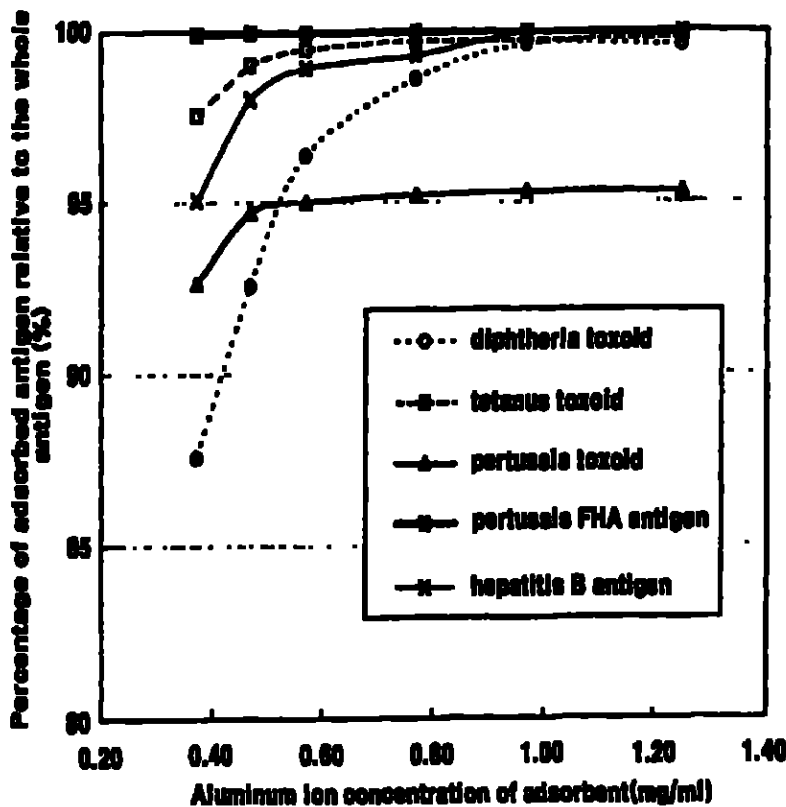
(43) International Publication Date
18 July 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/055105 A1

- (51) International Patent Classification⁷: A61K 39/29
(21) International Application Number: PCT/KR02/00034
(22) International Filing Date: 9 January 2002 (09.01.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Date: 2001-0001290 10 January 2001 (10.01.2001) KR
(71) Applicant (for all designated States except US): LG CHEM INVESTMENT, LTD. [KR/KR]; 20, Yoido-Dong, Youngdeungpo-Gu, 150-721 Seoul (KR).
(72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): KIM, Kye-wan/
(74) Agents: CHO, In-jae et al.; 7th Floor, HanJoongAng Bldg. 646-7, Yoksam-Dong, Kangnam-Gu, Seoul 135-911 (KR).
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, [Continued on next page]

(54) Title: MANUFACTURING METHOD OF COMBINED VACCINE



(57) Abstract: The present invention relates to a method for manufacturing a combined vaccine capable of concurrently preventing multiple diseases such as diphtheria, tetanus, pertussis, and hepatitis B which should be prevented in an infant. The method for manufacturing a combined vaccine according to the present invention includes the steps of independently adsorbing each protective antigen to an adsorbent of an aluminum hydroxide gel with respect to various diseases such as diphtheria, tetanus, pertussis, and hepatitis B which should be prevented in the infants, and combining each protective antigen adsorbed to the adsorbent after the adsorption. In the present invention, it is possible to concurrently prevent multiple diseases such as diphtheria, tetanus, pertussis, and hepatitis B which should be prevented in the infant using a combined vaccine manufactured according to the present invention.

WO 02/055105 A1

86
84




Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2020
Bogotá, D.C.,

Doctora:
Margarita Castellanos Abondano
Apoderada
LG Life Sciences, Ltd.

Oficio-N° . 07513

ASUNTO:	Radicación N°	03-58225
	Solicitud internacional	PCT/KR2002/00034
	Fecha inicio fase nacional	10/08/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486).
- ☐ La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

17 2 SET. 2003

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, _____.