

00-28930

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Organización CSA Ltda

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

00-28930

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO Composiciones de vacunas con
antigenos de streptococcus de virus
VSR y adyuvante estimulador de
respuesta TH1

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61 K 39/09

71. SOLICITANTE Smithline Beecham Biologicals S.a

DOMICILIO Rixensart, Belgica

74. APODERADO Berman Castillo Grau

22. BOGOTÁ, D. C.,

63

202037
2020108

BT



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Handwritten signature

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.** 00-28.930-

54. **TITULO** COMPOSICIONES DE VACUNAS CON ANTIGENOS DE STREPTOCOCCUS, DE VIRUS
VSR Y ADYUVANTE ESTIMULADOR DE RESPUESTA TH1

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** A 61K 39/09

71. **SOLICITANTE** SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS s.a.

DOMICILIO RIXENSART, BELGICA

74. **APODERADO** GERMAN CASTILLO GRAU

22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.** _____

63

202037
2020/08



00 28930

SOLICITUD DE

PAI
IN

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 00028930 00000000

Folios: 91

Fecha (AMD): 2003-04-19 13:57:48

Trámite: 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS s.a.

No. de Identificación _____

Representante Legal (Persona Jurídica) GERMAN CASTILLO GRAU

País de Domicilio BELGICA

Departamento o Estado _____

Dirección rue de l'Institut 89

Ciudad RIXENSART Teléfono _____

(74) DATOS DEL APODERADO PODER No. 16.769

Nombre GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección y Domicilio Carrera 13 No.37-43, Piso 12

Ciudad Santafé de Bogotá Teléfono 2 857460

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor(es) Marguerite Deschamps
Craig Antony Joseph Laferriere

Identificación _____

Dirección Rixensart, Bélgica
Rixensart, Bélgica

Ciudad _____ Teléfono _____

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCIÓN

(54) Título de la Invención NUEVAS COMPOSICIONES → Cambio Título:
COMPOSICIONES DE VACUNAS CON ANTIGENOS DE STREPTOCOCCUS DE VIRUS
VSR, Y ADYUVANTE ESTIMULADOR DE RESPUESTA TH-1

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐ TIPO DE PRIORIDAD ANDINA ☐ UNIONISTA ☒

(33) País GRAN BRETAÑA (32) Fecha Abril 20, 1999 (31) No. Solicitud 9909077.1

Para Publicar a los ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a una composición de vacuna que comprende:

(a) uno o más polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* conjugados con una proteína o un péptido, o no conjugados;

y

(b) un antígeno de VSR,

junto con un adyuvante que es un estimulador preferente de una respuesta inmune de tipo Th1. Las vacunas de combinación proporcionadas por la invención son útiles particularmente para los niños y para las personas de edad avanzada.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

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

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

FIRMA

NOMBRE GERMAN CASTILLO GRAU

CC. 17'017.671 Btá

T.P.No. 2978



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00328930 00000000 Folios: 91
Fecha (AMD): 2000-04-19 13:57:48
Tramite : 032 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
NIT : 8001 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 25,122
FECHA : ABRIL 19 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00024-9	919257	5,100,000.00

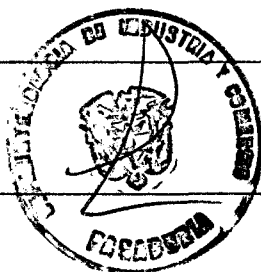
***** CONCEPTO *****

CANT.	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	608,000.00
1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
	TOTAL :	\$ 608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.



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

NUEVAS COMPOSICIONES

Esta invención se refiere a nuevas formulaciones de vacuna, a procedimientos para prepararlas y a su uso en 5 profilaxis y terapia. En particular, la presente invención se refiere a vacunas de combinación para la administración a niños y a personas de edad avanzada. Más particularmente, la invención se refiere a vacunas de combinación para proteger contra las infecciones o enfermedades producidas por 10 *Streptococcus pneumoniae* y por el Virus Sincitial Respiratorio (VSR).

Streptococcus pneumoniae es una bacteria gram positiva responsable de una morbilidad y mortalidad considerables, particularmente en la población joven y de edad avanzada. 15 Una colonización expansiva del tracto respiratorio y del oído medio, especialmente en niños pequeños, es la causa individual más común de las visitas a los hospitales en los Estados Unidos. La bacteria puede volverse invasiva, infectando los pulmones y produciendo neumonía. Se estima 20 una tasa de neumonía producida por neumococos en los Estados Unidos, para personas de más de 60 años, del 3 al 8 por 100.000. En el 20% de los casos esta enfermedad produce bacteremia y otras manifestaciones tales como meningitis, con una tasa de mortalidad próxima al 30% incluso con 25 tratamiento con antibióticos. Existen 90 serotipos conocidos

de *Streptococcus pneumoniae* que se determinan por las estructuras del polisacárido capsular que rodea a la bacteria, y éste es su principal factor de virulencia.

Se conoce una vacuna de neumococos 17-valente 5 (Moniarix), basada en los polisacáridos purificados de los serotipos de neumococo implicados más comúnmente en la enfermedad invasiva. El procedimiento de purificación de estos polisacáridos se describió en la Patente europea 72513 B1. Los ensayos de eficacia de la vacuna con vacunas de 10 menor valencia demostraron una eficacia del 70 al 90% con respecto a los serotipos presentes en la combinación. Los estudios controlados de casos realizados en los Estados Unidos con personas de más de 55 años usando una vacuna 14-valente demostraron una eficacia del 70% (Mills, O.F., y 15 Rhoads, G.G; J. Clin. Epidemiol. (1996); Vol. 49(6) 631-636). La inclusión de otros polisacáridos (para fabricar una vacuna de neumococos 23-valente) se aceptó basándose en una respuesta serológica adecuada, aunque faltaban datos de eficacia clínica (K. R. Brown En "Combined Vaccines and 20 Simultaneous Administration", Ed. Willians y col., New York Academy of Sciences 1995 pág. 241-249).

Se ha estudiado la inmunización simultánea con una vacuna de neumococo 23-valente (Pnu-Immune 23 - Lederle USA) y una vacuna de influenza (Fluarix) (TJ Fletcher, TW 25 Tunnicliffe, K Hammond, K Roberts, JG Ayres; (1997) Br. Med.

J. 314: 1663) y no se han detectado diferencias inmunológicas significativas entre la inmunización simultánea o inmunizaciones separadas por un intervalo de un mes.

5 Los polisacáridos de neumococo pueden volverse más inmunogénicos en lactantes mediante su acoplamiento químico a soporte proteicos. Se están realizando ensayos clínicos de eficacia para verificar este concepto para la eficacia en la prevención de la otitis media en lactantes.

10 A los infantes expuestos previamente a una vacuna de neumococo conjugado 7 ó 11-valente, se les puede administrar un refuerzo con la vacuna de neumococo de polisacárido sencillo 23-valente para aumentar la cobertura de serotipo y las concentraciones de IgG (Block, SL, JA. Hedrich, R.A. Smith, R.D. Tyler, M. Giordani, M.D. Blum, J. Sadoff, E. Keegan; Abstract G-88, 37th ICAAC, Toronto (1997); Anderson, E.L., Kennedy, D.J., Geldmacher, K.M., Donnelly, J., Mendelman, P; The Journal of Paediatrics, Mayo de 1996. Vo. 128, n° 5, Parte I, 649-653).

20 El Virus Sincitial Respiratorio (VSR) humano es un miembro de la familia Paramyxoviridae (paramixovirus) y produce enfermedades del tracto respiratorio inferior, particularmente en niños pequeños y en bebés. Los últimos informes sugieren que el VSR es un patógeno importante en
25 adultos, particularmente en personas de edad avanzada.

El VSR es un virus con envuelta, con un genoma de ácido ribonucleico (ARN) de cadena negativa, no segmentado, de 15.222 nucleótidos, que codifica 10 ARN mensajeros, codificando cada uno un solo polipéptido. Tres de las diez proteínas son proteínas superficiales transmembrana: la proteína G (de unión), la proteína F (de fusión) y la proteína SH. Dos proteínas son proteínas de la matriz de los viriones (M y M2), tres proteínas son componentes de la nucleocápsida (N, P y L) y dos proteínas son no estructurales (NS1 y NS2). Existen dos cepas antigénicamente distintas de VSR denominadas cepa A y B. La caracterización de las cepas de estos grupos ha determinado que las diferencias principales residen en las proteínas G, mientras que se conservan las proteínas F.

El Virus Sincitial Respiratorio (VSR) aparece en brotes estacionales, alcanzando un máximo durante el invierno en climas templados y durante la estación lluviosa en climas más cálidos (DeSilva LM & Hanlon MG. Respiratory Syncytial Virus: a report of a 5-year study at a children's hospital (Virus Sincitial Respiratorio: un informe de un estudio de 5 años en un hospital infantil). *J. Med Virol* 1986; **19**:299-305). Sea cual sea el área, el VSR tiende a tener un modelo regular y predecible y rara vez están presentes concurrentemente otros patógenos virales respiratorios que aparecen en brotes (Glezen WP & Denny FW. Epidemiology of

acute lower respiratory disease in children. *N. Engl. J. Med.* 1973; **288**:498-505).

El VSR es la causa principal de enfermedades graves del tracto respiratorio inferior en los niños. Se estima que el 5 40-50% de los niños hospitalizados con bronquiolititis y el 25% de los niños hospitalizados con neumonía se hospitalizan como resultado directo de las infecciones por VSR. La infección primaria por VSR normalmente se produce en niños menores de un año; a los dos años de edad, el 95% de los 10 niños tiene evidencia serológica de haber pasado una infección y en la mayoría de edad, el 100% de la población tiene esta evidencia.

En lactantes y en niños pequeños, la infección progresa desde el tracto respiratorio superior al inferior en 15 aproximadamente un 40% de los casos, y la presentación clínica es de bronquiolititis o neumonía. Los niños de 2 a 6 meses tienen un mayor riesgo de desarrollar manifestaciones graves de la infección por VSR (principalmente insuficiencia respiratoria); sin embargo, los niños de cualquier edad con 20 una enfermedad cardíaca o pulmonar subyacente, los niños prematuros y los lactantes que están inmunocomprometidos también presentan riesgos de complicaciones graves.

A lo largo de toda la vida aparecen reinfecciones sintomáticas y cada vez se ha hecho más evidente que el VSR 25 también es un patógeno importante en los adultos,

especialmente en personas de edad avanzada.

La reinfección por VSR casi no se diagnostica en los adultos, en parte porque se considera una infección de los niños. Por consiguiente, no se busca la evidencia del virus en adultos para explicar la enfermedad respiratoria. Además, el VSR es difícil de identificar en secreciones nasales de individuos que tienen algún grado de inmunidad parcial al virus, inmunidad que es frecuente en la inmensa mayoría de los adultos. Los adultos jóvenes o de mediana edad típicamente desarrollan un síndrome semejante a un resfriado persistente cuando se infectan por VSR. Los individuos de edad avanzada pueden desarrollar un síndrome respiratorio prolongado que es prácticamente indistinguible de la gripe, con síntomas del tracto respiratorio superior que pueden ir acompañados por una implicación del tracto respiratorio inferior, incluyendo neumonía. Las poblaciones institucionalizadas de edad avanzada son de una importancia particular, porque comprenden grandes números de individuos susceptibles agrupados conjuntamente. La propagación de la infección a través de tal población, en la que muchas personas tienen múltiples problemas médicos que pueden predisponerlas a un curso más grave de la enfermedad, es difícil de controlar.

Además, los informes de los estudios recientes que evalúan el impacto de la infección por VSR como causa de

hospitalización en adultos y en personas de edad avanzada sanas de la comunidad, indican además un papel importante de la infección por VSR en varias enfermedades del tracto respiratorio inferior en estas poblaciones (Dowell SF, 5 Anderson LJ, & Gary Jr HE y col., *J. Infect Dis* 1996; **174**:456-462; Falsey AR, Cunningham CK, & Barker WH, y col., *J. Infect Dis* 1995; **172**: 389-394). Dowell identificó al VSR como uno de los cuatro patógenos más comunes que causaban varias enfermedades del tracto respiratorio inferior que 10 ocasionaban la hospitalización de adultos (Dowell SF, Anderson LJ, & Gary Jr HE, y col., *J. Infect Dis* 1996; **174**:456-462). Falsey demostró que las infecciones graves por VSR en personas de edad avanzada no se limitan a situaciones de asilos o de brotes. Más bien, la infección por VSR es una 15 causa predecible de enfermedad grave entre pacientes de edad avanzada que residen en la comunidad. De forma similar a lo que ocurre en las hospitalizaciones debidas al virus influenza A, las relacionadas con infecciones por VSR se asociaron con una morbilidad sustancial, como se demuestra 20 por estancias prolongadas en el hospital, altos porcentajes de admisión en cuidados intensivos y altas tasas de ventilación asistida (Falsey AR, Cunningham CK, & Barker WH, y col., *J. Infect Dis* 1995; **172**:389-394).

Estos estudios indican la necesidad médica y económica 25 de una vacuna eficaz que pueda prevenir complicaciones

graves de la infección por VSR en lactantes, adultos y en ancianos tanto institucionalizados como sanos y que viven en la comunidad.

Para una vacuna de subunidad recombinante o una vacuna inactivada, es de importancia primordial el uso de un adyuvante. El alumbre es el único adyuvante autorizado actualmente para uso humano. Sin embargo, el alumbre tiene un efecto adyuvante limitado sobre la respuesta humoral y se sabe que induce principalmente una respuesta inmune de tipo Th2 (Byars NE, Nakano G, & Welch M, y col., *Vaccine* 1991; 9:309-318). Sin embargo, se ha descubierto que el monofosforilípido A 3-Des-O-acilado (3D-MPL) en combinación con el alumbre mejora la respuesta humoral y estimula preferentemente una inmunidad de tipo Th1. El adyuvante de sal de aluminio con 3D-MPL se denomina Alumbre/3D-MPL.

La presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende:

- (a) uno o más polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* conjugados con una proteína o un péptido, o no conjugados; y
 - (b) un antígeno de VSR,
- en combinación con un adyuvante que es un estimulador preferente de una respuesta de tipo Th1.

La tendencia hacia vacunas de combinación tiene la ventaja de reducir molestias al receptor, facilitar el programa y asegurar que se completa el régimen; pero también

¡Error! Marcador no definido.

Opcionalmente, la composición de vacuna de la invención comprende además uno o más de varios antígenos distintos tales como el antígeno del virus influenza. Las vacunas de virus influenza disponibles actualmente incluyen vacunas de virus enteros inactivados, vacunas de partículas escindidas y vacunas de subunidades. Las vacunas de virus influenza, de todos los tipos, normalmente son vacunas trivalentes. Contienen antígenos derivados de dos cepas de virus influenza A y una cepa de virus influenza B. Una dosis convencional de 0,5 ml de la mayoría de ellas contiene 15 μ g de componente de hemaglutinina de cada cepa.

El procedimiento para determinar las cepas a incorporar
25 en una vacuna de virus influenza es un proceso complejo que

7 implica la colaboración entre la Organización Mundial de la Salud, las autoridades sanitarias nacionales y los fabricantes de las vacunas.

Los polisacáridos de los neumococos pueden volverse más
5 inmunogénicos mediante su acoplamiento químico con soportes proteicos, y se están realizando ensayos clínicos de eficacia para verificar este concepto para la eficacia en la prevención de la otitis media en los lactantes.

Hay dos procedimientos de conjugación usados
10 generalmente para producir construcciones de polisacáridos inmunogénicas: (1) conjugación directa de carbohidratos y proteínas; y (2) conjugación indirecta de carbohidratos y proteínas mediante un reactivo espaciador o de engarce bifuncional. Generalmente, tanto la conjugación directa como
15 la conjugación indirecta requieren activación química del resto de carbohidrato antes de la transformación. Véase, por ejemplo, el documento US 5.651.971 y Dick & Beurret, "Glycoconjugates of Bacterial Carbohydrate Antigens", Conjugate Vaccines, J.M. Cruse & R.E. Lewis (eds), Vol. 10,
20 48-114 (1989).

El polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* presente en la composición de acuerdo con la invención preferiblemente, pero no necesariamente, está en una forma conjugada. No se excluye un polisacárido de *S. pneumoniae* no conjugado.

25 Los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*, si están

14

conjugados, están conjugados con una proteína o un péptido. Los antígenos de polisacáridos se han conjugado con varias proteínas de células T adyuvantes. Estas proporcionan epítomos de T adyuvantes. Las proteínas representativas 5 incluyen el Toxoide Diftérico, el Toxoide Tetánico y la proteína D o su lipoproteína D derivada lipídada de *Haemophilus influenzae* B. Otros soportes proteicos adecuados incluyen Diphtheria Crm 197 y la proteína no estructural principal del virus influenza, NS1 (particularmente los 10 aminoácidos 1-81).

La proteína D es un componente preferido de una vacuna de acuerdo con la invención en la que los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* están conjugados. También son adecuados fragmentos de la proteína D. La proteína D se 15 describe en el documento EP 0 594 610. Los fragmentos adecuados para el uso incluyen fragmentos que comprenden epítomos de T adyuvantes. En particular, un fragmento de proteína D preferiblemente contendrá el tercio N-terminal de la proteína.

20 Sorprendentemente, se ha descubierto además que combinando el polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con la proteína D con un antígeno de VSR en la composición de acuerdo con la invención, no se afecta a la respuesta inmune al componente de proteína D del conjugado.

25 La proteína D es un antígeno protector contra la infección

1. por *Haemophilus influenzae* B no tipificable (NTHi).

Así pues, la invención proporciona además una vacuna que comprende un antígeno VSR y al menos un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con una proteína D o un
5 fragmento de la misma, opcionalmente junto con un adyuvante tal como un adyuvante de inducción de Th1.

Típicamente, el componente de *Streptococcus pneumoniae* presente en una vacuna de la presente invención comprenderá antígenos de polisacárido (preferiblemente conjugados),
10 procediendo los polisacáridos de al menos cuatro serotipos de neumococo. Preferiblemente, los cuatro serotipos incluyen 6B, 14, 19F y 23F. Más preferiblemente, se incluyen al menos 7 serotipos en la composición, por ejemplo, los derivados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Aún más
15 preferiblemente, en la composición se incluyen al menos 11 serotipos, por ejemplo, la composición de una realización incluye polisacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (preferiblemente conjugados). En una realización preferida de la invención se
20 incluyen al menos 13, al menos 15 o al menos 17 antígenos de polisacárido (preferiblemente conjugados), aunque también se contemplan por la invención otros antígenos de polisacárido, por ejemplo, 23-valentes (tales como los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C,
25 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F).

Para la vacunación de personas de edad avanzada (por ejemplo, para la prevención de neumonía), es ventajoso incluir los serotipos 8 y 12F (y, más preferiblemente, también 15 y 22) en la composición antigénica 11-valente descrita anteriormente para formar una vacuna 15-valente, mientras que para lactantes o bebés que empiezan a dar sus primeros pasos (en los que tiene más importancia la otitis media), ventajosamente se incluyen los serotipos 6A y 19A para formar una vacuna 13-valente.

10 Los antígenos de VSR adecuados para la inclusión en las vacunas de acuerdo con la invención incluyen virus VSR inactivados, tales como virus VSR inactivados químicamente con, por ejemplo, formalina. El virus inactivado puede producirse, por ejemplo, a partir de un VSR atenuado que se
15 ha atenuado, por ejemplo, mediante pases o mediante manipulación genética, o puede producirse a partir de un VSR de tipo silvestre. Puede usarse un VSR recombinante que se haya modificado por ingeniería genética para que contenga un antígeno de envuelta de una cepa diferente de VSR, por
20 ejemplo, una estructura de la cepa A de VSR con una proteína de la envuelta de VSR B, opcionalmente atenuado.

Los antígenos de VSR adecuados incluyen, en particular, antígenos derivados del virus VSR, preferiblemente glicoproteínas de la envuelta del VSR humano, tales como
25 fragmentos inmunogénicos o de la proteína F o G de VSR, como

se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 5.149.650, o un polipéptido quimérico que comprende al menos un fragmento inmunogénico tanto de la proteína F como de la proteína G de VSR, ventajosamente una proteína quimérica FG 5 de VSR como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.194.595, preferiblemente expresada a partir de células CHO.

Preferiblemente, el antígeno de VSR es una glicoproteína de la envuelta de VSR o un derivado de la 10 misma. Preferiblemente, el antígeno procede la cepa A de VSR. Como alternativa, el antígeno puede proceder de la cepa B, o puede haber un antígeno de cada una de las cepas A y B en la composición. Los antígenos preferidos se seleccionan entre glicoproteína F, glicoproteína G, una proteína de 15 fusión FG o derivados inmunogénicos de las mismas.

Típicamente, los derivados inmunogénicos incluyen aquellos en los que la proteína carece del dominio transmembrana, es decir, $F \Delta_{tm}$, $G \Delta_{tm}$ y $F \Delta_{tm} G \Delta_{tm}$. Preferiblemente, la secuencia señal se deleta de la 20 proteína G. Se prefiere que esté presente al menos aproximadamente un 50% o al menos aproximadamente un 80% (secuencia contigua) del dominio extracelular de la proteína F o G. Los ejemplos particulares incluyen los aminoácidos 1-526 o 1-489 de la proteína F, los aminoácidos 69-298 o las 25 posiciones alternativas 97-279 de la proteína G, y la

proteína de fusión F1-526G69-298. Una fusión alternativa comprende los aminoácidos 1-489 de F seguidos por los aminoácidos 97-279 de la proteína G.

La composición de vacuna de VSR/*Streptococcus pneumoniae* de acuerdo con la invención comprende un adyuvante que es un inductor preferente de una respuesta de tipo Th1 que ayuda al tipo de respuesta mediada por las células del sistema inmune.

Una respuesta inmune contra un antígeno se genera a través de la interacción del antígeno con las células del sistema inmune. La respuesta inmune resultante puede clasificarse, en general, en dos categorías extremas, siendo las respuestas inmunes humorales o mediadas por células (caracterizadas tradicionalmente por la protección con anticuerpos y con mecanismos efectores celulares, respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado respuestas de tipo Th1 (respuestas mediadas por células) y respuestas inmunes de tipo Th2 (respuestas humorales).

Las respuestas inmunes extremas de tipo Th1 pueden caracterizarse por la generación de linfocitos T citotóxicos de haplotipo restringido, específicos de antígenos, y respuestas de células destructoras naturales. En ratones, las respuestas de tipo Th1 a menudo se caracterizan por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en

1. los seres humanos, estas respuestas corresponden a anticuerpos de tipo IgG1. Las respuestas inmunes de tipo Th2 se caracterizan por la generación de una amplia serie de isotipos de inmunoglobulinas que incluyen, en ratones, IgG1, 5 IgA e IgM.

Puede considerarse que la fuerza directora subyacente al desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunes son las citocinas, varios mensajeros proteicos identificados que sirven para ayudar a las células del sistema inmune y para 10 dirigir la respuesta inmune final a una respuesta Th1 o Th2. Así pues, los altos niveles de citocinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunes mediadas por células contra el antígeno dado, mientras que los altos niveles de citocinas de tipo Th2 tienden a favorecer la 15 inducción de las respuestas inmunes humorales contra el antígeno.

Es importante recordar que la distinción de las respuestas inmunes de tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad un individuo mantendrá una respuesta inmune que se 20 describe como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de lo descrito en relación con los clones de células T CD4 + ve murinas por Mosmann y Coffman (Mosmann, T. R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: 25 different patterns of lymphokine secretion lead to different

B45180

¡Error! Marcador no definido.

functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7, p145-173). Tradicionalmente, la respuestas de tipo Th1 están asociadas con la producción de las citocinas INF- γ e IL-2 por los linfocitos T. Otras citocinas a menudo asociadas directamente con la inducción de las respuestas inmunes de tipo Th1 no se producen por las células T, tales como la IL-12. Por el contrario, las respuestas de tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y el factor β de necrosis tumoral (TNF- β).

10 Se sabe que ciertos adyuvantes de vacunas son particularmente adecuados para la estimulación de las respuestas de citocinas de tipo Th1 o Th2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del equilibrio Th1:Th2 de la respuesta inmune después de una vacunación o infección incluyen la medición directa de la producción de citocinas Th1 o Th2 por linfocitos T *in vitro* después de la reestimulación con antígenos y/o la medición de la relación IgG1:IgG2a de las respuestas de anticuerpos específicos de antígenos.

20 Así pues, un adyuvante de tipo Th1 es uno que estimula poblaciones de células T aisladas para producir altos niveles de citocinas de tipo Th1 cuando se reestimula con un antígeno *in vitro*, e induce respuestas de inmunoglobulinas específicas de antígenos asociadas con el isotipo de tipo 25 Th1. Los sistemas adyuvantes adecuados que promueven una

21
1. respuesta predominantemente Th1 incluyen el Monofosforil
Lípido A o un derivado del mismo, particularmente
monofosforil lípido A 3-des-O-acilado, y una combinación de
monofosforil lípido A, preferiblemente monofosforil lípido A
5 3-des-O-acilado (3D-MPL) junto con una sal de aluminio.
Además, más adelante se describen sistemas adyuvantes
adecuados.

Tales adyuvantes se describen, por ejemplo, en las
Solicitudes de Patente internacionales Nos. WO 94/00153 y WO
10 95/17209.

3D-MPL se describe en el documento GB 2220211 (Ribi).
Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-
acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas y se fabrica por Ribi
Immunochem Montana. En la Patente europea EP 0 689 454 B se
15 describe una forma preferida de monofosforil lípido A 3-des-
O-acilado.

Preferiblemente, el tamaño de las partículas de 3D-MPL
es suficientemente pequeño como para que pueda filtrarse de
forma estéril a través de una membrana de 0,22 micrómetros
20 (como se describe en la Patente europea EP 0 689 454).

3D-MPL normalmente estará presente en el intervalo de
10 µg - 100 µg, preferiblemente de 25-50 µg por dosis, en la
que el antígeno típicamente estará presente en un intervalo
de 2-50 µg por dosis.

25 Otro adyuvante preferido comprende QS21, una fracción

no tóxica purificada por HPLC de una saponina obtenida a partir de la corteza de Quillaja Saponaria Molina. Opcionalmente, éste puede mezclarse con monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), opcionalmente junto con un 5 vehículo.

En la patente de Estados Unidos No. 5.057.540 se describe un procedimiento para producir QS21 (como QS21).

En el documento WO 96/33739 se describen formulaciones adyuvantes no reactogénicas que contienen QS21. Se ha 10 demostrado que tales formulaciones, que comprenden QS21 y colesterol, son adyuvantes estimuladores de Th1 satisfactorios cuando se formulan junto con un antígeno. Así pues, las composiciones de vacuna que forman parte de la presente invención pueden incluir una combinación de QS21 y 15 colesterol.

Otros adyuvantes que son estimuladores preferentes de la respuesta Th1 incluyen oligonucleótidos inmunomoduladores, por ejemplo, secuencias CpG no metiladas, como se describe en el documento WO 96/02555.

20 También se contemplan combinaciones de diferentes adyuvantes estimuladores de Th1, tales como los mencionados anteriormente en este documento, para proporcionar un adyuvante que sea un estimulador preferente de una respuesta de tipo Th1. Por ejemplo, QS21 (preferiblemente también con 25 colesterol) puede formularse junto con 3D-MPL. La relación

B45180

¡Error! Marcador no definido.

de QS21:3D-MPL típicamente será del orden de 1:10 a 10:1; preferiblemente de 1:5 a 5:1 y, a menudo, sustancialmente de 1:1. El intervalo preferido de 3D MPL:QS21 para conseguir una sinergia óptima es de 2,5:1 a 1:1.

5 Preferiblemente, en la composición de vacuna de acuerdo con la invención también está presente un vehículo. El vehículo puede ser una emulsión de aceite en agua o una sal de aluminio.

Una emulsión de aceite en agua preferida comprende un 10 aceite metabolizable, tal como escualeno, alfatocoferol y Tween 80. Además, la emulsión de aceite en agua puede contener Span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

En un aspecto preferido, a la composición de la invención se añadirá hidróxido de aluminio (alumbre) o 15 fosfato de aluminio para aumentar la inmunogenicidad.

En un aspecto particularmente preferido, los antígenos de la composición de vacuna de acuerdo con la invención se combinan con 3D-MPL y alumbre.

Típicamente, para la administración a los seres 20 humanos, QS21 y 3D-MPL estarán presentes en una vacuna en el intervalo de 1 μg - 200 μg , tal como de 10-100 μg y, preferiblemente, de 10 μg - 50 μg por dosis. Típicamente, el aceite en agua comprenderá de un 2 a un 10% de escualeno, de un 2 a un 10% de alfatocoferol y de un 0,3 a un 3% de Tween 25 80. Preferiblemente, la relación de escualeno:alfatocoferol

es igual o inferior a 1, ya que esta relación proporciona una emulsión más estable. Span 85 también puede estar presente en un nivel del 1%. En algunos casos puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan 5 además un estabilizante.

Las emulsiones de aceite en agua no tóxicas preferiblemente contienen un aceite no tóxico, preferiblemente escualano o escualeno, y un emulsionante, por ejemplo, Tween 80, en un vehículo acuoso. El vehículo 10 acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

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

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

La preparación de las vacunas se describe, en general, en Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design - 20 the subunit and adjuvant approach, editado por Powell y Newman, Plenum Press, 1995; New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, Estados Unidos 1978. La encapsulación dentro de liposomas se describe, por ejemplo, por Fullerton, 25 Patente de Estados Unidos 4.235.877. La conjugación de

proteínas con macromoléculas se describe, por ejemplo, por Likhite, Patente de Estados Unidos 4.372.945 y por Armor y col., Patente de Estados Unidos 4.474.757.

La cantidad de proteína en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin los efectos secundarios adversos significativos observados en las vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo del inmunógeno específico que se emplee. Generalmente, es de esperar que cada dosis comprenda 1-1000 mg de proteína, preferiblemente 2-100 mg y, más preferiblemente, 4-40 mg. La cantidad óptima para una vacuna particular puede determinarse mediante estudios convencionales que implican la observación de las valoraciones de anticuerpos y otras respuestas en los sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir un refuerzo en aproximadamente 4 semanas. Para los lactantes en particular, pueden preferirse tres dosis.

Además de la vacunación de personas susceptibles a infecciones por *Streptococcus pneumoniae* o por VSR, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para tratar, inmunoterapéuticamente, pacientes que sufren dichas infecciones.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de fabricación de una formulación de vacuna

26
como se describe en este documento, comprendiendo el procedimiento mezclar un antígeno de *Streptococcus pneumoniae* y un antígeno de VSR con un adyuvante de inducción de Th-1, por ejemplo, 3D-MPL y, preferiblemente, un vehículo, por ejemplo, alumbre.

Si se desea, pueden añadirse otros antígenos en cualquier orden conveniente para proporcionar composiciones de vacuna multivalentes como se describe en este documento.

La invención proporciona además un procedimiento para producir una composición de vacuna, que comprende mezclar un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con la proteína D con un antígeno de VSR y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En los ejemplos que se indican a continuación, se realizó la evaluación del efecto de la combinación de un candidato de vacuna de VSR, FG con la vacuna de neumococo 23-valente disponible en el mercado (Pneumune de Wyeth-Lederle), en un modelo de ratón. Este modelo ensayó una inmunización combinada en la que las vacunas se mezclan físicamente y se inyectan en el mismo sitio. Los resultados de este estudio demuestran una sinergia mutua, dando como resultado una mejor respuesta para ciertos marcadores inmunológicos para las dos vacunas.

Los ejemplos demuestran además una vacuna combinada con un candidato de vacuna de VSR y una vacuna de neumococo 11-

B45180

¡Error! Marcador no definido.

valente conjugado, en un modelo de ratón. Este estudio demuestra que para la mayoría de los marcadores inmunológicos no hay ninguna interferencia o sólo existen interferencias minoritarias entre los antígenos, pero, de hecho, para algunos marcadores inmunológicos hay una mayor respuesta y, por lo tanto, un efecto sinérgico. Notablemente, no hay ninguna reducción en la respuesta inmune al componente de proteína D del polisacárido de neumococo conjugado.

10

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Evaluación de vacuna combinada de VSR + neumococo 23-valente

1. Proceso de formulación:

Se adsorbió antígeno FG diluido con H₂O (2 µg:1/10 HD) durante 15 minutos sobre 50 µg de Al(OH)₃. Cuando se usó, se añadieron 5 µg de 3D-MPL a la preparación como una suspensión de partículas de 100 nm y la mezcla se incubó durante 30 minutos. Después, las formulaciones se tamponaron con PBS concentrado 10 veces, pH 7,4. Cuando se usaron, se añadió la vacuna de neumococo 23-valente (11,5 µg:1/50 HD) 15 minutos después de la adición de la solución de tampón. Para los grupos sin FG, se siguió la misma secuencia de formulación de forma que primero se adsorbió 3D-MPL sobre Al(OH)₃ antes de añadir la vacuna de neumococo 23-valente.

B45180

¡Error! Marcador no definido.

- Quince minutos después de la adición del tampón concentrado o de la vacuna 23-valente, se añadió fenoxietanol (5 mg/ml) a las formulaciones como conservante.

Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y con agitación. Las formulaciones se prepararon simultáneamente para las dos inyecciones, con una maduración de 7 días de las formulaciones finalizadas antes de la primera inyección.

Composición de constituyentes de formulación:

COMPONENTE	NÚMERO DE LOTE	CONCENTRACIÓN (µg/ml)	TAMPÓN
FG	54/023	265	10 PO ₄ , 150 NaCl pH 6,8
Al(OH) ₃	96A0089	10380	H ₂ O
23-Valente	Pneumune	1150	solución salina
3D-MPL	109	964	H ₂ O

10

2. Protocolo de inmunización

Se inmunizaron 11 grupos de 10 ratones por vías diferentes (50 µl), en los días 0 y 28, con diversas formulaciones (véase la **Tabla 1**). Los Grupos 7 y 8 se
15 inmunizaron con VSR vivos por vía intranasal (60 µl). Se

obtuvieron sueros en los días 28 (28 d Post I) y 42 (14 d Post II). En el día 42 se recogieron células de bazo y de ganglios linfáticos de 5 ratones de los Grupos 4, 5, 6, 7, 8 y 9, así como de 5 ratones Balb/c con los que no se había experimentado (Grupo 1, no inmunizado).

3. Respuesta humoral

3.1. Anticuerpos anti-FG:

Se obtuvieron todos los resultados humorales para los 10 ratones/grupo (respuesta individual para las valoraciones anti-FG y sueros reunidos para el perfil de isotipos) y los resultados celulares se presentaron para 5 ratones/grupo.

Los sueros individuales se obtuvieron 28 días después de la primera inmunización y 14 días después de la segunda inmunización, y se ensayaron con respecto a la presencia de anticuerpos Ig específicos para FG y su distribución de isotipos (IgG2a, IgG1).

El protocolo de ensayo fue el siguiente: recubrimiento durante una noche a 4°C con 50 µl de FG 54/023 (1 µg/ml) purificado por pocillo, saturación durante 1h a 37°C, incubación con suero durante 1,5 h a 37°C, incubación con Ig biotina anti-ratón 1/1500 (o IgG1, IgG2a biotina 1/1000) durante 1,5 h a 37°C, incubación con estrepta-peroxidasa 1/2500 durante 30 min a 37°C, incubación con OPDA Sigma 15 min a TA e interrupción con H₂SO₄ 2 N.

Las medidas de DO se controlaron a 490 nm y las

B45180

¡Error! Marcador no definido.

valoraciones se determinaron por Softmaxpro (ecuación de cuatro parámetros) mediante referencia a una curva patrón y se expresaron en EU/ml.

Los sueros individuales obtenidos 14 d Post II se ensayaron con respecto a la presencia de anticuerpos neutralizadores usando el siguiente protocolo: se incubaron 50 μ l de diluciones en serie a la mitad de suero (primera dilución 1/25) durante 1 hora, a 37°C, con 50 μ l de una mezcla que contenía 300 pfu de VSR-A/Long (Lote 14) y complemento de cobaya (dilución 1/25) en una placa de 96 pocillos por duplicado. Después se añadieron a cada pocillo 100 μ l de una suspensión de células HEp-2, con una concentración de 10^5 células/ml, y las placas se incubaron durante 4 días a 47°C en presencia de un 5% de CO₂.

Posteriormente se aspiraron los sobrenadantes y, después de la adición de 100 μ l de una preparación WST-1 (dilución 1/12,5), las placas se incubaron adicionalmente durante 24 horas a 37°C en presencia de un 5% de CO₂. Las medidas de DO se controlaron a 595 nm y las valoraciones se determinaron por regresión lineal ($y=a.\log x + b$): valoración = dilución de suero que proporciona una reducción del 50% de la DO máxima observada para las células no infectadas.

Los controles del ensayo incluían un grupo de sueros humanos escogidos al azar (reserva humana) y Sandoglobulina

B45180

¡Error! Marcador no definido.

(lote 069, IgG humana genérica producida por Sandoz).

3.2. *IgG Anti-Polisacárido de neumococo:*

Se midió la IgG murina contra polisacáridos de neumococo de los tipos 6B, 14, 19F y 23F mediante un ELISA, en un procedimiento adaptado a partir del protocolo CDC. Este protocolo incluye la adición de un polisacárido soluble de la pared celular (CPS) al suero para inhibir la medición de anticuerpos contra CPS. CPS es una fosforilcolina que contiene ácido teicoico común para todos los neumococos. Está presente debajo de la cápsula, y los anticuerpos contra dicho polisacárido sólo son débilmente protectores. Como CPS está asociado al polisacárido capsular, normalmente hay de un 0,5 a un 1% de CPS contaminando al polisacárido capsular purificado usado para recubrir las placas ELISA. Así pues, la medición de los anticuerpos contra CPS puede confundir la interpretación de los resultados ELISA con respecto al polisacárido capsular.

El ELISA se realizó con polisacáridos recubiertos a 20, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ en tampón carbonato para los tipos 6B, 14, 19F y 23F, respectivamente. Los sueros se mezclaron previamente con el equivalente CPS a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ en suero no diluido y se incubaron durante 30 minutos antes de la adición a la placa ELISA. La IgG murina se detectó con IgG (H+L) peroxidasa de anti-murina de cabra de Jackson ImmunoLab a una dilución de 1:2000. Las curvas de

valoración se relacionaron con los anticuerpos monoclonales murinos específicos del polisacárido de concentración conocida para cada serotipo usando una comparación logarítmica logística por SoftMax Pro. Los monoclonales 5 usados fueron HASP4, PS14/4, pS19/5 y PS23/22 para los tipos 6B, 14, 19F y 23F respectivamente. Debido a la cantidad limitada de suero disponible, se ensayaron los sueros reunidos y, por lo tanto, no se dispone de un análisis estadístico.

10 4. Respuesta celular

Se aislaron células de bazo y de ganglios linfáticos 14d Post II de los Grupos 4-9 y de ratones sobre los que no se había experimentado previamente (Grupo 1), para uso como control negativo para el análisis de la respuesta celular 15 específica de FG. Las muestras se analizaron tanto con respecto a la linfoproliferación específica de FG como con respecto a la secreción de citocinas (IFN- γ + IL-5).

La proliferación se evaluó después de una incubación de 96 horas de de placas de 96 pocillos 4×10^5 células/pocillo 20 con 200 μ l de medio que contenía de 10 a 0,03 μ g/ml de FG (diluciones de tres veces). Tras la incorporación de ^3H -timidina, se midió la proliferación específica de FG siguiendo el protocolo convencional de los presentes solicitantes. La inducción de citocinas se evaluó después de 25 una incubación de 96 horas de placas de 24 pocillos $2,5 \times 10^6$

células por pocillo con 1 ml de medio que contenía de 10 µg a 0,01 µg de FG (dilución de 10 veces). Después se recogieron los sobrenadantes para determinar la cantidad de IFN-γ e IL-5 inducida por ELISA siguiendo el protocolo 5 convencional de los presentes solicitantes.

1. GRUPOS

Diez grupos recibieron dos inmunizaciones de diversas formulaciones que contenían la vacuna 23-valente, FG o una combinación de ambas vacunas formuladas con hidróxido de 10 aluminio y 3D-MPL o hidróxido de aluminio solo. El Grupo 1 constituye el control para los estudios CMI. Los Grupos 2 y 9 permitirán la evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna de neumococo 23-Valente tras la inmunización peritoneal que se usó en la bibliografía para la evaluación 15 de la vacuna 23-Valente, y tras la inmunización IM. Los Grupos 3 y 10 permiten un análisis paralelo al de los Grupos 2 y 9, con la excepción de que la vacuna de neumococo 23-Valente se formula con Alumbre/3D-MPL. Los Grupos 2 y 3 también constituyen controles para el impacto de Alumbre/3D- 20 MPL sobre la vacuna de neumococo 23-valente cuando no se combina con FG Alumbre/3D-MPL. El Grupo 4 también permitirá la evaluación de la respuesta inmune inducida tras la inmunización IM de la combinación de la vacuna de neumococo 23-Valente y FG Alumbre/3D-MPL. Los Grupos 5 y 6 constituyen 25 un control para la evaluación del impacto de Alumbre/3D-MPL

34

B45180 ¡Error! Marcador no definido.

sobre FG cuando no se combina con la vacuna de neumococo 23-Valente. Las inmunizaciones con VSR vivos eran un control para la respuesta inmune inducida tras la infección IN con VSR naturales (Grupo 7). Finalmente, el Grupo 9 es un control para el impacto de Alumbre/3D-MPL solo.

TABLA 1

Grupos	Antígeno	Adyuvante	Vía
1	ninguno	ninguno	
2	Pneumune 23-Valente (11,5 µg)	ninguno	IM
3	Pneumune 23-Valente (11,5 µg)	Alumbre/3D-MPL	IM
4	Pneumune 23-Valente (11,5 µg)/FG (2 µg)	Alumbre/3D-MPL	IM
5	FG (2 µg)	Alumbre/3D-MPL	IM
6	FG (2 µg)	Alumbre	IM
7	VSR vivo (Lote 14: 10 ⁵ PFU)	ninguno	IN
8	ninguno	Alumbre/3D-MPL	IM
9	Pneumune 23-Valente (11,5 µg)	ninguno	IP
10	Pneumune 23-Valente (11,5 µg)	Alumbre/3D-MPL	IP

2. RESPUESTA HUMORAL

2.1. Anticuerpos Anti-FG

10 El análisis de anticuerpos específicos anti-FG a 28 d Post I y 14 d Post II muestra la inducción de respuestas de

anticuerpos similares tras la Inmunización con FG Alumbre/3D-MPL/23-Valente (Grupo 4) o FG Alumbre/3D-MPL solo (Grupo 5), observándose valoraciones ligeramente mayores para FG Alumbre/3D-MPL/23-Valente (**Figura 1**). La 5 inmunización con FG Alumbre (Grupo 6) induce valoraciones de anticuerpos esperadamente menores en los dos puntos de tiempo. El análisis estadístico demuestra que, efectivamente, existe una diferencia significativa entre las valoraciones de Ig anti-FG inducidas por los Grupos 4-6 a 28 10 d Post I y 14 d Post II.

RESULTADOS

El análisis de anticuerpos neutralizadores anti-VSRA (**Figura 2**) presenta un perfil paralelo al observado para las respuestas de Ig anti-FG.

15 Basándose en los resultados anteriores, se calculó la relación de anticuerpos neutralizadores anti-FG/anti-VSR (28 d Post II) y se demostró que la relación de FG Alumbre/3D-MPL/23-Valente, FG Alumbre/3D-MPL y FG Alumbre es similar a la relación inducida por el grupo VSR IN (**Tabla 2**).

36

B45180

¡Error! Marcador no definido.

TABLA 2

Candidato de Vacuna	Grupo (No.)	Valoraciones de Anticuerpo (GMT)					
		28 d Post I			14 d Post II		
		Ig ELISA anti-FG	VSR-A Neutra	Relación ELISA/Neutra	Ig ELISA Anti-FG	VSR-A Neutra	Relación ELISA/Neutra
FG SB AS4/23 valente	4	3836	392	10	121707	5809	21
FG SB AS4	5	2713	187	15	78079	4664	17
FG Alumbre	6	1721	117	15	26163	2771	9
VSR vivo	7	703	35	20	17119	726	24

Como en el análisis estadístico profundo sobre las Ig anti-FG, las valoraciones de los isotipos IgG1 e IgG2a demostraron que la adición de la vacuna 23-valente a FG Alumbre/3D-MPL mantiene las respuestas de Ig e IgG1 y 5 aumenta significativamente las respuestas de IgG2a (**Figura 3A**). Además, el análisis demostró que la relación IgG1/IgG2a y la valoración de IgG1 de FG Alumbre/3D-MPL/23 valente y FG Alumbre/3D-MPL fueron similares aunque significativamente diferentes de las de FG Alumbre (**Figura 10 3B**). Las tres formulaciones tuvieron diferencias significativas en sus valoraciones de IgG2a.

2.2. IgG anti-Polisacárido de neumococo

Aunque los ratones y otros roedores pueden producir IgM contra inmunógenos que son polisacárido, normalmente 15 no producen IgG contra polisacáridos. Esto es así porque su sistema inmune carece de las señales para inducir el cambio de isotipo a un antígeno independiente de células T tal como un polisacárido. Así pues, la medición de la IgG anti-polisacárido en ratones es un ensayo sensible para la 20 inducción de una respuesta inmune independiente de células T mejorada.

En la **Tabla 3** se presentan las concentraciones de IgG inducidas contra cuatro de los 23 polisacáridos. Como se indicó en otros experimentos, no se produjo ninguna IgG 25 contra los polisacáridos de los tipos 6B y 23F. Sin

B45180

¡Error! Marcador no definido.

embargo, se pudieron medir IgG producidas contra los tipos 14 y 19F.

Los grupos que no contenían vacuna 23-Valente mostraron algunas IgG detectables contra los polisacáridos 14 y 19F, lo que confirma la especificidad de las mediciones.

Una comparación de la vía de inmunización revela que cuando a la vacuna 23-valente se le añade un adyuvante de Alumbre/3D-MPL, la vía intramuscular parece ser mejor que la intraperitoneal para el tipo 19F, mientras que ocurre lo contrario para el tipo 14. Con la vacuna 23-Valente sola no parece haber una diferencia significativa.

23-Valente + Alumbre/3D-MPL induce una mayor respuesta de IgG para los tipos 14 y 19F, tanto en la vía de inmunización IM como en la IP, en comparación con la vacuna 23-Valente sola. Sin embargo, cuando se combina con FG, hay una reducción en la respuesta de IgG. Sin embargo, la respuesta de IgG contra 19F en 23-Valente+FG/Alumbre/3D-MPL aún es mayor que la inducida por la vacuna 23-Valente sola (compárense los grupos 3 y 4), y se mejora la respuesta al tipo 14.

3. RESPUESTA CELULAR

La linfoproliferación específica de FG inducida no mostró ninguna diferencia entre FG Alumbre/3D-MPL +/- 23-Valente y FG Alumbre, ni en las células de bazo ni en las 5 células de ganglios linfáticos.

El análisis de la producción de IL-5 e IFN- γ sugiere que la mezcla de la vacuna 23-valente con FG Alumbre/3D-MPL no impide la producción de IFN- γ , pero podría aumentar en alguna medida la producción de IL-5 (**Figura 4**). Esta observación se confirma por una diferencia de 2 a 8 veces en la relación IFN- γ /IL-5 observada a dos dosis de FG (10 y 1 μ g de FG/ml) usadas para la reestimulación *in vitro*. Sin embargo, la vacuna FG Alumbre/3D-MPL/23-valente aún induce una relación IFN- γ /IL-5 mucho mayor que FG Alumbre.

15 CONCLUSIONES

El análisis de la Ig anti-FG inducida específica y de las valoraciones de anticuerpos neutralizadores anti-VSRA demuestra que la combinación de FG Alumbre/3D-MPL con la vacuna de neumococo 23-valente no impide la inducción de la respuesta observada con FG Alumbre/3D-MPL sola. La calidad de la respuesta medida por la relación de anticuerpos neutralizadores anti-FG/anti-VSRA también permanece constante y próxima a la relación observada tras la infección natural con VSR verdaderos por vía IN.

El análisis de la respuesta inducida mediada por células específicas para FG sugiere que la adición de la vacuna 23-valente a FG Alumbre/3D-MPL no afecta a la inducción de la linfoproliferación ni en células de bazo 5 ni en células de ganglios linfáticos. Además, la inducción de la respuesta de tipo Th1 observada típicamente con FG Alumbre/3D-MPL no se impide por la adición de la vacuna 23-valente como se mide por la producción de citocinas in vitro de células de bazo y de ganglios linfáticos 10 específicas de FG y parece aumentarse cuando se analiza la distribución de anticuerpos de isotipo específico para FG. De hecho, la producción de IFN- γ , un marcador de una respuesta Th1, permanece constante tras la adición de la vacuna 23-valente a FG Alumbre/3D-MPL, mientras que la 15 producción de IL-5, marcador de una respuesta Th2, sólo se aumenta ligeramente. De forma interesante, la adición de la vacuna 23-valente a FG Alumbre/3D-MPL aumenta significativamente la producción de anticuerpos IgG2a, marcadores de una respuesta Th1, mientras que no afecta a 20 la respuesta de IgG1 (marcador de una respuesta Th2) ni a la respuesta de IgG1/IgG2a.

Así pues, la combinación de FG Alumbre/3D-MPL y vacuna 23-Valente no afecta a la respuesta observada con FG Alumbre/3D-MPL y, por lo tanto, se mantienen las 25 ventajas asociadas a la formulación de FG Alumbre/3D-MPL

B45180 ¡Error! Marcador no definido.

frente a FG Alumbre, es decir, la inducción de una respuesta elevada de anticuerpos neutralizadores primaria y secundaria y de una respuesta Th1, como se mide por la presencia de anticuerpos IgG2a y la inducción por altos niveles de IFN- γ .

La combinación de Pneumune 23-Valente con FG Alumbre/3D-MPL produce una mayor producción de IgG en 2 de los 4 polisacáridos ensayados, pero más dramáticamente para el tipo 19F. La vacuna 23-Valente sola con 10 Alumbre/3D-MPL proporciona las mayores concentraciones de IgG.

En conclusión, existe una combinación favorable de vacuna de neumococo 23-Valente con VSR FG Alumbre/3D-MPL en la que existe un efecto sinérgico para las dos vacunas, 15 ya que las dos vacunas muestran mejoras en ciertos ensayos inmunológicos y no muestran ninguna inhibición en los ensayos.

EJEMPLO 2 - Evaluación de una vacuna combinada de VSR + neumococo conjugado 11-valente

20 La vacuna de combinación se evaluó con 3D-MPL + alumbre, con 3D-MPL + QS21 en liposomas que contenían colesterol o con oligonucleótidos que contenían CpG (con o sin alumbre).

También se evaluó el impacto de la vacuna de 25 combinación sobre la respuesta inmune de IgG al soporte

proteico D (PD).

PD es un antígeno protector contra la infección por *Haemophilus influenzae* B no tipificable (NTHi). Por lo tanto, la combinación de PS de neumococo conjugado con PD 5 y FG podría conferir una protección eficaz contra tres patógenos: *S. pneumoniae*, VSR y *Haemophilus influenzae* B no tipificable. En la protección contra NTHi probablemente está implicada una inmunidad de tipo Th1. Por lo tanto, también se ensayaron los anticuerpos IgG2a anti-PD, que 10 son un buen indicador de una respuesta Th1.

La vacuna candidata 11-valente usada en este ejemplo incluye los polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F que se obtuvieron esencialmente como se describe en el documento EP 72513. 15 Cada polisacárido se activa y transforma usando la química de CDAP (documento WO 95/08348) y se conjuga con el soporte proteico. Todos los polisacáridos se conjugan en su forma nativa, con la excepción del serotipo 3 (que se redujo de tamaño para reducir su viscosidad).

20 El soporte proteico era la proteína D (PD) recombinante de *Haemophilus influenzae* no tipificable, expresada en *E. coli*.

1. Proceso de formulación:

Las formulaciones se prepararon 12 días antes de la 25 primera inyección.

1.1 Formulaciones basadas en QS21 y 3D-MPL

Cuando fue necesario, los antígenos (FG (2 μ g) y/o conjugados de PS no adsorbidos (0,5 μ g/valencia)) se diluyeron en una mezcla de PBS concentrado 10 veces a pH 7,4 y H₂O. QS21 (5 μ g) se añadió como una mezcla con liposomas que contenían MPL en una relación de pesos QS21/colesterol de 1/5 (denominado DQ/3D-MPLin). Treinta minutos después se añadió 1 μ g/ml de tiomersal como conservante.

10 1.2. Formulaciones basadas en CpG o 3D-MPL

Cuando fue necesario, el Al(OH)₃ se diluyó en H₂O antes de la adición de los antígenos (FG (2 μ g) o/y conjugados de PS no adsorbidos (0,5 μ g/valencia)). Después de una adsorción de 30 minutos, se añadió MPL o CpG. Treinta minutos después, las formulaciones se tamponaron con PO₄-NaCl pH 6,8, concentrado 10 veces. Después se añadió tiomersal a una concentración de 1 mg/ml o fenoxi a una concentración de 5 mg/ml, como conservante.

Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y con agitación. Las formulaciones se prepararon simultáneamente para las dos inyecciones con una maduración de 7 días de las formulaciones finalizadas antes de la primera inyección.

B45180

;Error!Marcador no definido.

1.3 Composición de constituyentes de las formulaciones:

COMPONENTE	CONC. DE AG O IMST ($\mu\text{g/ml}$)	CONC DE AL ⁺⁺⁺ ($\mu\text{g/ml}$)	TAMPÓN
FG	484		PO ₄ /NaCl 10/150 mM pH 6,8
Clínica undecaval. sin adyuvantes			
PS1	144		NaCl 150 mM pH 6,1
PS3	149		NaCl 150 mM pH 6,1
PS4	125		NaCl 150 mM pH 6,1
PS5	135		NaCl 150 mM pH 6,1
PS6b	206		NaCl 150 mM pH 6,1
PS7	168		NaCl 150 mM

B45180

¡Error! Marcador no definido.

			pH 6,1
PS9	175		NaCl 150 mM pH 6,1
PS14	180		NaCl 150 mM pH 6,1
PS18	127		NaCl 150 mM pH 6,1
PS19	140		NaCl 150 mM pH 6,1
PS23	158		NaCl 150 mM pH 6,1
QS21	2000		H ₂ O
MPL	1019		H ₂ O
CpG	5000		H ₂ O
SUV	DOPC 40000 Col 10000 MPL 2000		PBS pH 7,4
AlPO ₄		1000	NaCl 150 mM pH 6,1
Al(OH) ₃		10380	H ₂ O

2. Protocolo de inmunización:

14 grupos de 10 ratones se inmunizaron por vía IM (50 μ l), en los días 0 y 28, con diversas formulaciones (véase la **Sección de resultados**). Los sueros se obtuvieron en el día 42 (14 d Post II). En el día 42 también se recogieron 5 células de bazo de 5 ratones de los grupos inmunizados con antígeno FG así como de 5 ratones Balb/c sobre los que no se había experimentado anteriormente.

3. Respuesta humoral

3.1. Anticuerpos anti-FG:

10 Se obtuvieron todos los resultados humorales para 10 ratones/grupo (respuesta individual para Ig anti-FG, IgG1 e IgG2a y valoraciones de neutralización) y los resultados celulares se presentaron para 5 ratones/grupo del conjunto.

15 Se obtuvieron sueros individuales 14/15 días después de la segunda inmunización y se ensayaron con respecto a la presencia de anticuerpos Ig específicos para FG y su distribución de isotipos (IgG2a, IgG1). El protocolo de ensayo fue el siguiente: recubrimiento durante una noche a 20 4°C con 50 μ l de FG DFGP 107 (1 μ g/ml) purificado por pocillo, saturación durante 1 h a 37°C, incubación con suero durante 1,5 horas a 37°C, incubación con Ig biotina anti-ratón 1/1500 (o IgG1, IgG2a biotina 1/1000) durante 1,5 horas a 37°C, incubación con estrepta-peroxidasa 25 durante 30 min a 37°C, incubación con OPDA Sigma durante

B45180

¡Error! Marcador no definido.

20 min a TA e interrupción con H_2SO_4 2 N.

Se controló la DO a 490 nm y las valoraciones se determinaron por Softmaxpro (ecuación de 4 parámetros) mediante referencia a una curva patrón y se expresaron en 5 EU/ml.

Los sueros individuales obtenidos 14 d Post II se ensayaron con respecto a la presencia de anticuerpos neutralizadores usando el siguiente protocolo: se incubaron 50 μ l de diluciones en serie a la mitad de 10 sueros (primera dilución 1/25) durante 1 hora a 37°C con 50 μ l de una mezcla que contenía 3000 pfu de VSR-A/Long (Lote 14) y complemento de cobaya (dilución 1/25) en una placa de 96 pocillos, por duplicado. Después se añadieron a cada pocillo 100 μ l de una suspensión de células Hep-2 a 15 una concentración de 10^5 células/ml, y las placas se incubaron durante 4 días a 37°C en presencia de CO_2 al 5%.

Posteriormente se aspiraron los sobrenadantes y, después de la adición de 100 μ l de una preparación de WST-1 (dilución 1/15), las placas se incubaron adicionalmente 20 durante 24 h a 37°C en presencia de un 5% de CO_2 . Las DO se controlaron a 490 nm y las valoraciones se determinaron mediante regresión lineal ($y=a.\log x + b$): valoración = dilución de suero que proporciona una reducción al 50% de la DO máxima observada para las células no infectadas.

3.2. IgG Anti-Polisacárido de Neumococo:

Se midieron IgG murinas contra polisacárido de neumococo de los tipos 3, 6B, 7F, 14, 19F y 23F mediante un ELISA en un procedimiento adaptado a partir del protocolo CDC. Este protocolo incluye la adición de polisacáridos solubles de la pared celular (CPS) a los sueros para inhibir la medición de anticuerpos contra CPS. CPS es una fosforilcolina que contiene ácido teicoico común para todos los neumococos. Está presente debajo la cápsula, y los anticuerpos contra este polisacárido son sólo débilmente protectores. Como CPS está asociado al polisacárido capsular, normalmente hay de un 0,5 a un 1% de CPS contaminando al polisacárido capsular purificado usado para recubrir las placas ELISA. Así pues, la medición de los anticuerpos CPS puede confundir la interpretación de los resultados ELISA con respecto al polisacárido capsular.

El ELISA se realizó con polisacáridos recubiertos a 20, 5, 5, 20 y 20 $\mu\text{g/ml}$ en tampón PBS para los tipos 6B, 7F, 14, 19F y 23F respectivamente. Los sueros se mezclaron previamente con el equivalente de 500 $\mu\text{g/ml}$ de CPS en suero no diluido y se incubaron durante 30 minutos antes de la adición a la placa ELISA. La IgG murina se detectó con IgG (H+L) peroxidasa anti-murina de cabra, de Jackson ImmunoLab, a una dilución de 1:5000. Las curvas de

B45180

¡Error! Marcador no definido.

valoración se relacionaron con los anticuerpos monoclonales murinos específicos para el polisacárido de concentración conocida para cada serotipo usando una comparación logarítmica logística por SoftMax Pro. Los 5 anticuerpos monoclonales usados fueron HASP4, PS7/19, PS14/4, PS19/5 y PS23/22 para los tipos 6B, 7F, 14, 19F y 23F, respectivamente.

En el caso del serotipo 3 se realizó un ELISA similar, con la excepción de que las inmunoplasmas primero se recubrieron con albúmina de suero humano metilada (1 μ g/ml en PBS, 2 horas, 37°C) para mejorar el recubrimiento de PS3 (2,5 μ g/ml en PBS, durante una noche, 4°C). Como patrón de referencia se usó el anticuerpo monoclonal PS3/6.

15 3.3. Dosis ELISA de IgG de suero anti-PD

Se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp Nunc a 37°C, durante 2 horas, con 100 μ l/pocillo de antígeno PD a una concentración de 2 μ g/ml diluido en PBS (en las filas B a H de la placa) o con 100 μ l de Ig anti-ratón, de cabra, (Jackson) purificada, a una concentración de 1 μ /ml, en PBS (fila A). Posteriormente, se incubaron diluciones en serie a la mitad (en tampón PBS Tween 20 0,05%, 100 μ l por pocillo) de IgG de ratón pura (Jackson), que se añadió como curva patrón (partiendo de 1 μ g/ml y poniéndolas en

B45180

¡Error! Marcador no definido.

la fila A), y muestras de suero (partiendo con una dilución 1/20 y poniéndolas en las filas B a H), durante una noche a 4°C. Después se incubaron IgG anti-ratón, de cabra, conjugada con peroxidasa (Jackson), diluida 1/5000 en tampón PBS Tween 20 al 0,05% (100 µl/pocillo) durante 30 minutos, a 20°C, con agitación. Después de varios lavados, las placas se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con 100 µl/pocillo de tampón de revelado (OPDA 0,4 mg/ml (Sigma) y H₂O₂ al 0,05% en tampón citrato 4,5 100 mM pH). El revelado se interrumpió mediante la adición de 50 µl/pocillo de HCl 1 N. Las densidades ópticas se leyeron a 490 y 620 nm usando un inmunolector Emax (Molecular Devices). Las valoraciones de anticuerpo se calcularon por el procedimiento matemático de 4 parámetros usando el software SoftMaxPro.

3.4. Dosis ELISA de IgG1, 2a y 2b de suero anti-PD

Se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp Nunc durante una noche a 4°C con 50 µl/pocillo de antígeno PD a una concentración de 2 µg/ml diluido en PBS (en las filas B a H de las placas) o con 50 µl de Ig anti-ratón, de cabra, (Boehringer) purificada, a una concentración 5 µg/ml, en PBS (fila A). Después de la saturación de la placa con tampón PBS Tween 20 al 0,05% y BSA al 1%, se incubaron diluciones en serie a la mitad (en tampón de saturación,

B45180

;Error!Marcador no definido.

50 μ l por pocillo) de anticuerpos monoclonales IgG1, IgG2a o IgG2b de ratón puros (Sigma), añadidas como curva patrón (partiendo con 200 ng/ml y poniéndolas en la fila A), y muestras de suero (partiendo con una dilución 1/20 en 5 tampón de saturación y poniéndolas en las filas B a H) durante 1 hora a 3°C con agitación. Después de varios lavados con NaCl al 0,9% y tampón Tween 20 al 0,05%, se incubaron (50 μ g/pocillo) IgG biotiniladas de cabra anti-IgG1 de ratón, anti-IgG2a de ratón o anti-IgG2b de ratón 10 (Amersham) diluidas 1/1000 en tampón de saturación, durante 30 minutos, a 20°C, con agitación. Después de más lavados, las placas se incubaron durante 30 minutos, a 20°C, con agitación, con estreptavidina conjugada con peroxidasa (Amersham) diluida 1/1000 en tampón de 15 saturación (50 ml/pocillo). Después de los lavados, el revelado se realizó añadiendo 50 μ l/pocillo de tampón de revelado (OPDA 0,4 mg/ml (Sigma) y H₂O₂ al 0,05% en tampón citrato 100 mM pH 4,5) durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El revelado se interrumpió 20 añadiendo 50 μ l/pocillo de HCl 1 N. Las densidades ópticas se leyeron a 490 y 620 nm usando un inmunolector Emax (Molecular Devices). Las valoraciones de anticuerpos se calcularon por el método matemático de 4 parámetros usando el software SoftMaxPro.

4. Respuesta celular

Se aislaron células de bazo 14 d Post II a partir de todos los grupos inmunizados con FG, así como de ratones sobre los que no se había experimentado previamente para uso como control negativo, para el análisis de la respuesta celular específica de FG. Las muestras se analizaron tanto con respecto a la linfoproliferación específica de Fg como con respecto a la secreción de citocinas (IFN- γ + IL-5).

10 La proliferación se evaluó después de una incubación de 96 h de placas de 96 pocillos 4×10^5 células/pocillo con 200 μ l de medio que contenía de 10 a 0,03 μ g/ml de FG (diluciones de tres veces). Después de la incorporación de ^{3} H-timidina, se midió la proliferación específica de FG
15 siguiendo el protocolo convencional de los presentes solicitantes.

La inducción de citocinas se evaluó después de una incubación de 96 horas de placas de 24 pocillos $2,5 \times 10^6$ células por pocillo con 1 ml de medio que contenía de 10
20 μ g a 0,01 μ g de FG (diluciones de 10 veces). Después se recogieron los sobrenadantes para determinar la cantidad de IFN- γ e IL-5 inducidos por ELISA después del protocolo convencional de los presentes solicitantes.

RESULTADOS

1. GRUPOS

14 grupos recibieron dos inmunizaciones IM, con un intervalo de 28 días entre ellas, de diversas formulaciones que contenían la vacuna conjugada 11-5 valente, FG o una combinación de ambas formuladas con alumbre 3D-MPL, CpG, Cpg alumbre o alumbre.

Se discuten los resultados presentados en las Secciones 1 a 4. En cada Sección, los resultados de FG Alum se incluyen como control para la inducción de una respuesta inmune específica de VSR con un adyuvante predominantemente de tipo Th2. También se añadió un grupo de ratones sobre los que no se había experimentado previamente para uso como control interno del análisis de CMI específico de FG.

15 Sección 1:

Grupos	Antígeno	Adyuvante	Vía
A	PS-PD (0,5 µg)	Alumbre/3D-MPL	IM
B	FG (2 µg)	Alumbre/3D-MPL	IM
C	PS-PD (0,5 µg) + FG (2 µg)	Alumbre/3D-MPL	IM
D		Alumbre	IM
E	FG (2 µg)	ninguno	IP
	ninguno		

Sección 2:

B45180

;Error!Marcador no definido.

Grupos	Antígeno	Adyuvante	Vía
A	PS-PD (0,5 µg)	3D-MPL + QS21	IM
B	FG (2 µg)	3D-MPL + QS21	IM
C	PS-PD (0,5 µg) + FG (2 µg)	3D-MPL + QS21	IM
D	FG (2 µg)	Alumbre	IM
E	ninguno	ninguno	IP

Sección 3:

Grupos	Antígeno	Adyuvante	Vía
A	PS-PD (0,5 µg)	CpG (50 µg)	IM
B	FG (2 µg)	CpG (50 µg)	IM
C	PS-PD (0,5 µg) + FG (2 µg)	CpG (50 µg)	IM
D	PS-PD (0,5 µg)	CpG (50 µg) Alumbre	IM
E	FG (2 µg)	CpG (50 µg) Alumbre	IM
F	PS-PD (0,5 µg) + FG (2 µg)	CpG (50 µg) Alumbre	IM
G	FG (2 µg)	Alumbre	IM
H	ninguno	ninguno	

Sección 4:

Los mismos grupos que para la Sección 3

5 2. SECCIÓN 1:**2.1. Anticuerpos Anti-FG:**

FG/Alumbre/3D-MPL y FG/Alumbre/3D-MPL combinado con el conjugado de PS 11-valente (**Figura 5**) indujeron niveles de anticuerpos neutralizadores anti-VSRA similares. De hecho, puede observarse un ligero efecto sinérgico para la inducción de anticuerpos neutralizadores de VSRA con la combinación de las dos vacunas.

Los análisis de las valoraciones de isotipos individuales IgG1 e IgG2a anti-FG demostraron la inducción de valoraciones similares o ligeramente menores por FG/Alumbre/3D-MPL/conjugado de PS 11-valente frente a

FG/Alumbre/3D-MPL (**Figura 6**).

El análisis de la relación de isotipos entre IgG2a e IgG1 indica que la presencia de las dos vacunas no altera la relación de isotipos, la cual sigue siendo mucho menor que la inducida por FG Alumbre, un adyuvante de inducción de Th2 reconocido.

2.2. IgG anti-Polisacárido de Neumococo

Las valoraciones de IgG en suero contra los polisacáridos 3, 6B, 14, 19F y 23F se midieron como se describe en el Ejemplo 1. Se indujeron respuestas de anticuerpos similares tras la inmunización con la formulación de conjugado de PS 11-valente/Alumbre/3D-MPL y con la misma vacuna suplementada con antígeno FG (**Figura 7**). Este resultado demostró que la combinación de conjugados de PS de neumococo y antígeno FG de VSR dentro de una formulación de Alumbre 3D-MPL no reducía ni alteraba la respuesta inmune contra el neumococo.

2.3. Respuesta Celular Específica de FG

El análisis de la producción de IL-5 e IFN- γ sugiere que la mezcla de FG/Alumbre/3D-MPL con el conjugado de PS 11-valente afecta en alguna medida al nivel de producción de estas citocinas (**Figura 8**). Sin embargo, la relación de las citocinas medidas, como indicador del perfil Th de la respuesta, no se ve afectada por la mezcla y sigue siendo bastante diferente de la relación observada para la

formulación de FG Alumbre, un adyuvante que induce Th2.

3. SECCIÓN 2: DQ/3D-MPLin

3.1. Anticuerpos Anti-FG:

5 FG DQ/3D-MPLin y FG DQ/3D-MPLin combinado con el conjugado de PS 11-valente (**Figura 9**) indujeron niveles de anticuerpos Ig anti-FG similares.

Como se ve para el análisis de Ig anti-FG, no se observa ninguna interferencia sobre los niveles de
10 anticuerpos neutralizadores anti-VSRA cuando se mezcla FG DQ-MPLin con el conjugado de PS 11-valente (**Figura 10**).

El análisis de las valoraciones individuales de isotipos IgG2a e IgG1 anti-FG demostró la inducción de valoraciones similares por FG DQ-MP/conjugado de PS 11-
15 valente frente a FG DQ-MP solo (**Figura 11**). El análisis de la relación de isotipos indica que la combinación de las vacunas no altera la relación de isotipos, que sigue siendo mucho menor que la inducida por FG Alumbre, un adyuvante de Th2 reconocido.

20 3.2. IgG anti-Polisacárido de Neumococo

Las valoraciones de IgG en suero contra los polisacáridos 3, 6B, 14, 19F y 23F se midieron como se describe en el Ejemplo 1. Se indujeron respuestas de anticuerpos similares tras la inmunización con el
25 conjugado de PS 11-valente/DQ/3D-MPLin y con la misma

vacuna suplementada con antígeno FG (**Figura 12**). Este resultado demostró que la combinación de conjugados de PS de neumococo y antígeno FG de VSR dentro de una formulación DQ/3D-MPLin no reducía ni alteraba la respuesta inmune contra los neumococos.

3.3. Respuesta Celular Específica de FG

El análisis de la producción de IL-5 e IFN- γ sugiere inicialmente que la mezcla de FG DQ/3D-MPLin con el conjugado de PS 11-valente afecta en alguna medida al nivel de producción de IFN- γ (**Figura 13**). El análisis adicional de la relación de las citocinas medidas, indicador del perfil de Th de la respuesta, demuestra que la mezcla de FG DQ/3D-MPLin con el conjugado de PS 11-valente afecta en alguna medida sobre el perfil de Th. Sin embargo, para la combinación de los dos antígenos con DQ/3D-MPLin se mantiene la predominancia de IFN- γ con respecto a IL-5 y sigue siendo mucho mayor que la que se observaba para FG Alumbre, un adyuvante de inducción de Th2 reconocido.

4. SECCIÓN 3: CpG Y CpG Alumbre

4.1. Anticuerpos anti-FG:

FG CpG y FG CpG combinado con el conjugado de PS 11-valente (**Figura 14**) indujeron niveles similares de anticuerpos Ig anti-FG. También puede observarse la ausencia de interferencia debida a la mezcla de FG CpG y

el conjugado de PS 11-valente para las formulaciones basadas en CpG y alumbre.

Como se ve para el análisis de Ig anti-FG, no se observa ninguna interferencia sobre los niveles de 5 anticuerpos neutralizadores anti-VSRA cuando se mezcla FG CpG o FG CpG alum con el conjugado de PS 11-valente (**Figura 15**).

El análisis de las valoraciones de isotipos individuales IgG2a e IgG1 anti-FG no mostró interferencia 10 en la adición del conjugado de PS 11-valente a las formulaciones FG CpG o FG CpG alumbre (**Figura 16**).

Otro análisis de la relación de isotipos IgG1/IgG2a indica que la mezcla de las dos vacunas no altera la relación de isotipos, que sigue siendo mucho menor que la 15 inducida por FG Alumbre, un adyuvante de Th2.

4.2. IgG Anti-Polisacárido de Neumococo

Las valoraciones de IgG en suero contra los polisacáridos 3, 6B, 7F, 14, 19F y 23F se midieron como se describe en el Ejemplo 1. En el presente ejemplo se 20 ensayaron dos formulaciones de adyuvante: CpG y Alumbre/CpG. Para las dos formulaciones de adyuvante, las valoraciones de IgG anti-PS fueron al menos similares en los animales que recibieron el conjugado de PS 11-valente suplementado con FG en comparación con los animales 25 inmunizados con el conjugado de PS 11-valente solo (**Figura**

17). Este resultado demostró que la combinación de conjugados de PS de neumococo y antígeno FG de VSR dentro de una formulación de CpG o de Alumbre y CpG no reducía ni alteraba la respuesta inmune contra los neumococos. Las 5 valoraciones de anticuerpos contra los serotipos 7F y 14 incluso mejoraron significativamente en presencia de FG usando la formulación adyuvante de CpG.

4.3. Respuesta Celular Específica de FG

El análisis de la producción de IL-5 e INF- γ sugiere 10 que la mezcla de FG CpG o CpG alumbre y el conjugado de PS 11-valente no afecta al nivel de producción de estas citocinas ni a la relación INF- γ /IL-5 (**Figura 18**). Por lo tanto, para las dos combinaciones dentro de las formulaciones CpG y CpG alumbre se mantiene la 15 predominancia de INF- γ , un marcador de una respuesta Th1.

La inducción de INF- γ incluso se mejoró en presencia de FG usando la formulación de adyuvante CpG.

5. SECCIÓN 4:

Se evaluó el impacto de la adición de FG en 20 formulaciones conjugadas de PS sobre la respuesta inmune de IgG al soporte proteico D (PD). PD es un antígeno protector contra la infección por *Haemophilus influenzae* B no tipificable (NTHi). Probablemente, en la protección contra NTHi está implicada una inmunidad mediada por

células de tipo Th1. Por lo tanto, también se ensayaron los anticuerpos IgG2a anti-PD, que son un buen indicador de una respuesta a Th1.

5.1. Anticuerpos Anti-FG

5 Véase la Sección 3.

5.2. IgG Anti-Polisacárido de Neumococo

Véase la Sección 3.

5.3. Respuesta Celular Específica de FG

Véase la Sección 3.

10 5.4. Dosis ELISA de IgG, IgG1, 2a y 2b de suero anti-PD

Como se muestra en la **Figura 19**, las respuestas de IgG en suero totales contra el soporte PD no se vieron afectadas significativamente por la presencia de FG en las formulaciones de conjugados de PS de neumococo, fuera cual fuera el adyuvante usado (CpG o Alumbre CpG). La alta proporción de anticuerpos IgG2a anti-PD en suero (aproximadamente un 30% de las IgG totales) inducida tras la vacunación con formulaciones de CpG o de conjugado de Alum CpG no se modificó por la adición de FG a esas formulaciones (**Figura 20**). Tal respuesta de IgG2a fue indicativa de una fuerte inmunidad Th1. Considerados en conjunto, estos resultados demostraron que la combinación de PS de neumococo conjugado con PD y antígeno FG de VSR dentro de una formulación CpG o Alumbre CpG no alteraba la respuesta inmune anti-PD.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

SECCIÓN 1: Alumbre/3D-MPL

Los resultados demostraron que la combinación de conjugados de PS de neumococo y antígeno FG de VSR dentro de una formulación de Alumbre 3D-MPL no altera las respuestas inmunes humorales contra los neumococos. El nivel de respuesta inmune específica para FG tanto humoral como celular parece estar ligeramente afectado por la mezcla, sin embargo ésta no afecta al perfil de Th o a la formulación de FG solo.

Sección 2: DQ/3D-MPLin

Los resultados demostraron que la combinación de conjugados de PS de neumococo y antígeno FG de VSR en una formulación con DQ/3D-MPLin no altera la respuesta inmune humoral contra el neumococo o las respuestas específicas de FG humorales. Un análisis adicional de la respuesta celular sugiere que la combinación de los dos antígenos en una formulación con DQ/3D-MPL afecta en alguna medida a la inducción del IFN- γ . Sin embargo, esto no afecta al perfil de Th en comparación con la formulación de FG (solo).

Sección 3: CpG/CpG Alumbre

El resultado demostró que la combinación de conjugados PS de neumococo y antígeno FG de VSR en una formulación con CpG o Alumbre CpG no reducía ni alteraba la respuesta inmune humoral contra el neumococo o las

respuestas específicas de FG humorales y celulares.

Sección 4: CpG/CpG Alumbre

Los resultados demostraron que la combinación de PS de neumococo conjugado con PD y antígeno FG de VSR en una formulación con CpG o Alumbre CpG no reducía ni alteraba la respuesta inmune anti-PD.

En conclusión, existe una combinación favorable de vacuna de neumococo 23-Valente con FG de VSR y 3D-MPL, en la que hay un efecto sinérgico para las dos vacunas, ya que las dos vacunas muestran mejoras en ciertos ensayos inmunológicos y ninguna inhibición en ninguno de los ensayos. A partir de los resultados presentados anteriormente, también se observa la combinación favorable cuando se combina un PS de neumococo conjugado con PD 11-15 valente con FG de VSR dentro de una serie de adyuvantes de Th1. De hecho, para la mayoría de las lecturas inmunológicas de los diversos adyuvantes de Th1 ensayados, la combinación de antígenos de vacuna no perjudica o solo perjudica ligeramente (y no significativamente por lo que 20 respecta a la respuesta global) a las características pre-existentes de cualquiera de las vacunas. Como se observa cuando se combina FG con la vacuna 23-valente del Ejemplo 1, en algunos casos una u otra vacuna mostraban mejoras en ciertos ensayos inmunológicos.

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vacuna que comprende:
- (a) uno o más polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* conjugados con una proteína o un péptido, o no conjugados; y
 - (b) un antígeno de VSR,
- 10 junto con un adyuvante que es un estimulador preferente de una respuesta de tipo Th1.
2. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polisacárido de
- 15 *Streptococcus pneumoniae* se conjuga preferentemente con una proteína del grupo que comprende: Proteína D de *Haemophilus influenzae* B o un fragmento de la misma, una versión lipidada de la proteína D (lipoproteína D); toxina tetánica y toxina diftérica.
- 20
3. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además un vehículo.
- 25 4. Una composición de vacuna de acuerdo con una

6. cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el
estimulador preferente de una respuesta de tipo Th1 es al
menos un adyuvante seleccionado entre el grupo de
adyuvantes que comprende: 3D-MPL, 3D-MPL en el que el
5 tamaño de las partículas de 3D-MPL es preferiblemente de
aproximadamente 100 nm o menos, QS21, una mezcla de QS21 y
colesterol, y un oligonucleótido CpG.

5. Una composición de vacuna de acuerdo con la
10 reivindicación 4, en la que el estimulador preferente de
la respuesta de tipo Th1 comprende 3D-MPL.

6. Una composición de vacuna de acuerdo con la
reivindicación 5, que comprende además QS21.

15

7. Una composición de vacuna de acuerdo con una
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el
polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* es una vacuna de
polisacárido de neumococo 23-valente[?].

20

8. Una composición de vacuna de acuerdo con una
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el
polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* es una vacuna de
polisacárido de neumococo 11-valente[?] conjugado.

25

B45180

¡Error! Marcador no definido.

9. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el antígeno de VSR es una glicoproteína de la envuelta ^{oligomérica} del VSR humano.

5

10. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el antígeno de VSR es una proteína quimérica FG o un fragmento de la misma.

10

11. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que además está presente un antígeno del virus influenza.

15 12. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el vehículo se selecciona entre el grupo compuesto por hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y tocoferol y una emulsión de aceite en agua.

20

13. Un procedimiento de preparación de una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende mezclar un antígeno de *Streptococcus pneumoniae* y un antígeno de VSR con un adyuvante de inducción de Th1.

B45180

¡Error! Marcador no definido.

14. Un procedimiento de preparación de una composición de vacuna, que comprende mezclar un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con la proteína D o un 5 fragmento del mismo, con un antígeno de VSR y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. Un procedimiento para la prevención o mejoría de una infección por VSR y/o *Streptococcus pneumoniae* en un 10 paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz de una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 al paciente.

RESUMEN

Esta invención se refiere a una composición de vacuna que comprende:

(a) uno o más polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* 5 conjugados con una proteína o un péptido, o no conjugados;

y

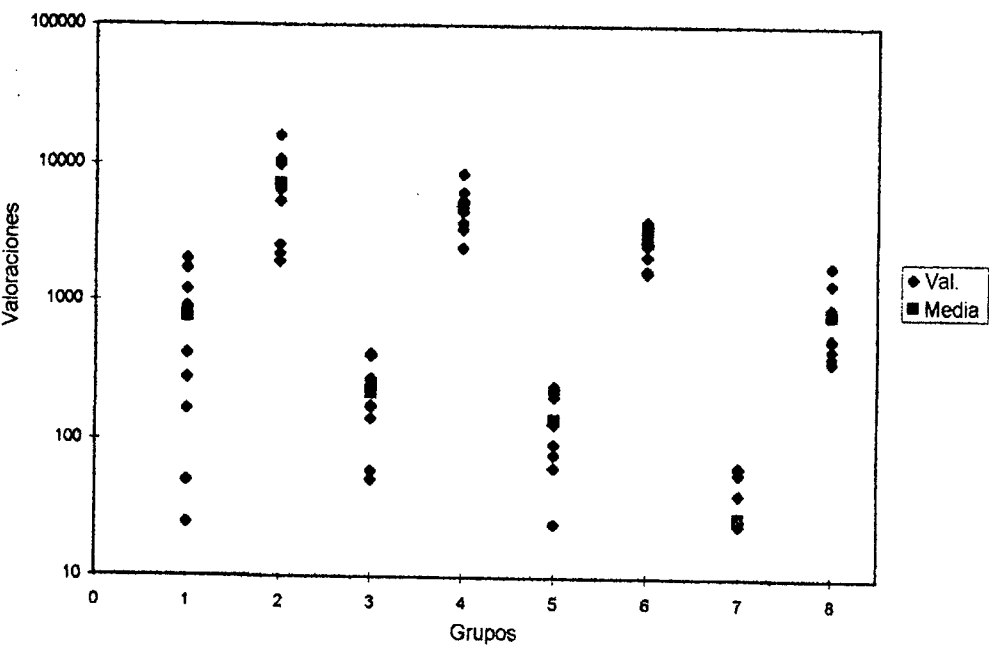
(b) un antígeno de VSR,

junto con un adyuvante que es un estimulador preferente de una respuesta inmune de tipo Th1. Las vacunas de 10 combinación proporcionadas por la invención son útiles particularmente para los niños y para las personas de edad avanzada.

97

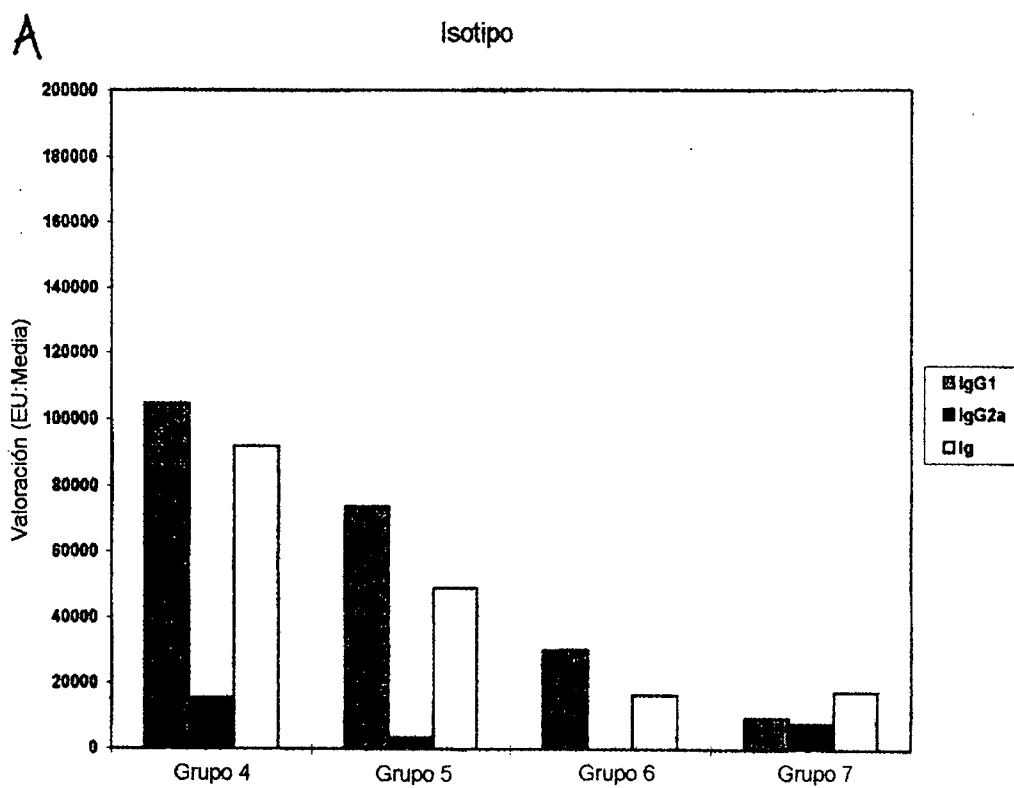
Fig. 2

Anticuerpos neutralizadores anti-VSRA



¡Error! Marcador no definido.

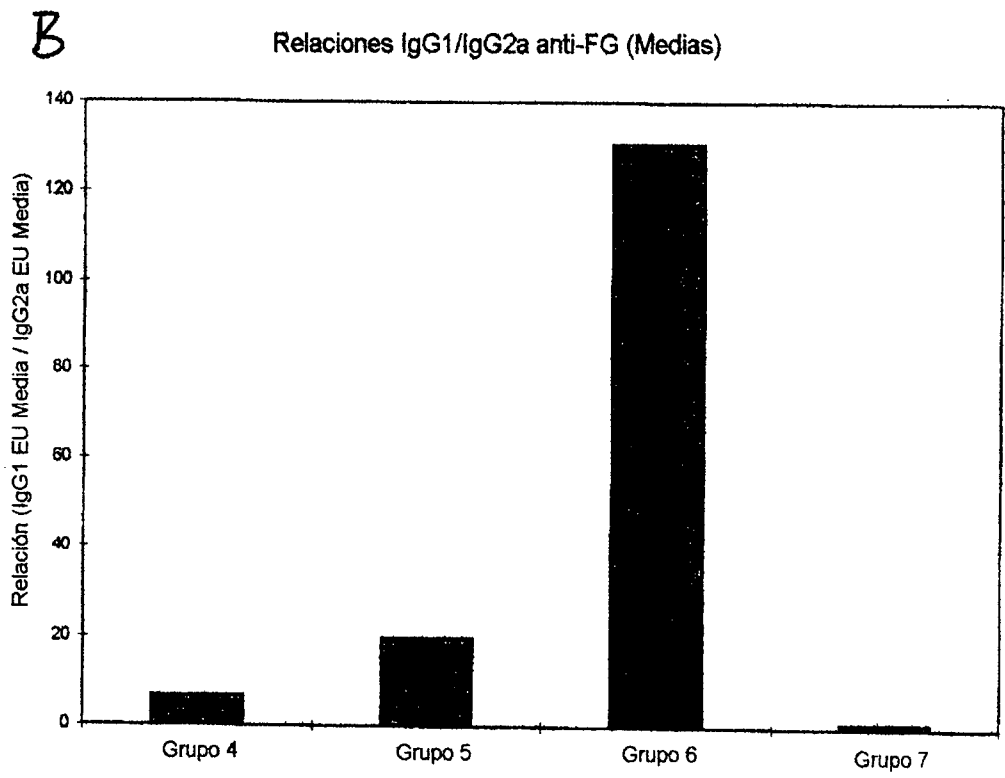
Fig. 3



¡Error! Marcador no definido.

23

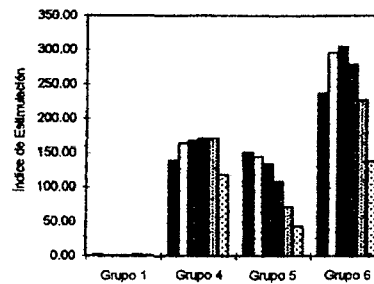
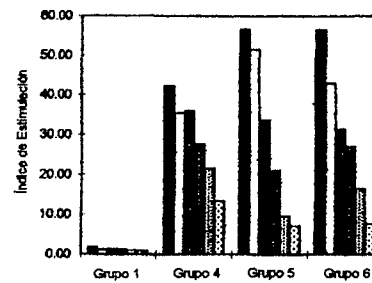
Fig. 3 (Cont.)



¡Error! Marcador no definido.

!Error! Marcador no definido.

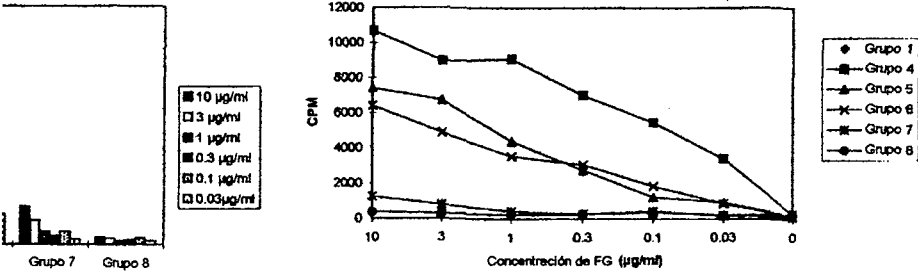
Fig. 4



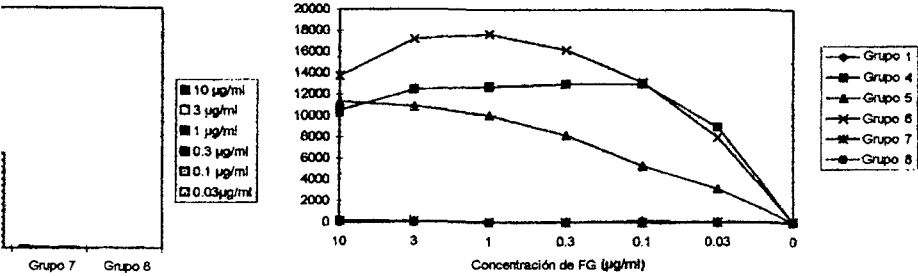
Group 1 : Sin tratar
Group 4 : FG SB AS4 / 23 valente
Group 5 : FG SBAS4
Group 6 : FG Alumbre

B45180

Linfoproliferación de linfocitos de bazo

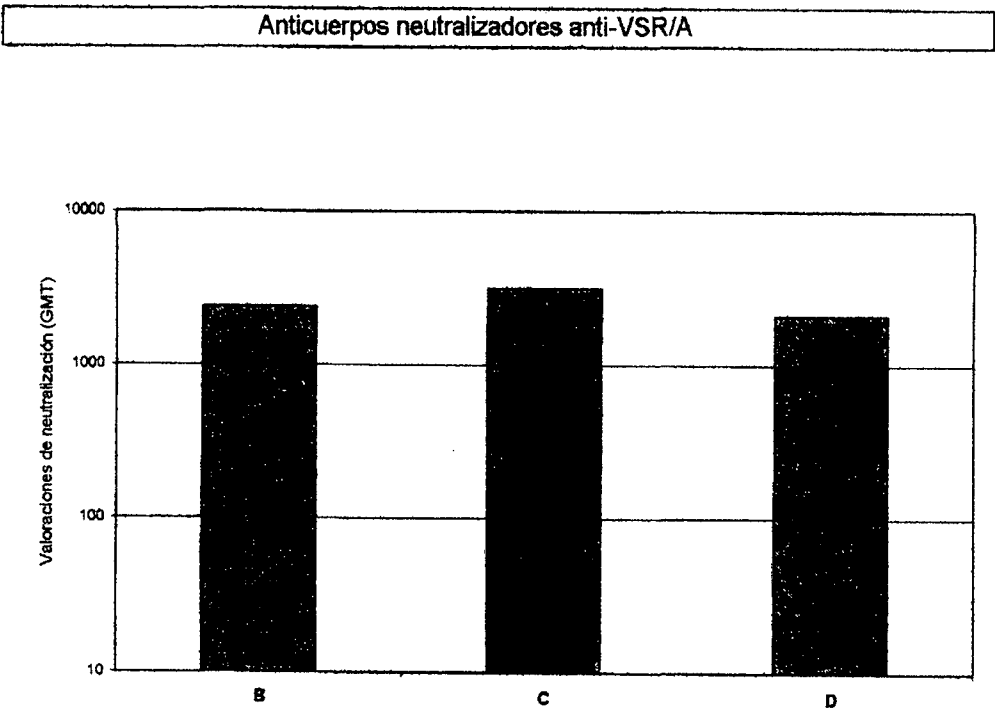


Linfoproliferación de linfocitos de ganglios linfáticos



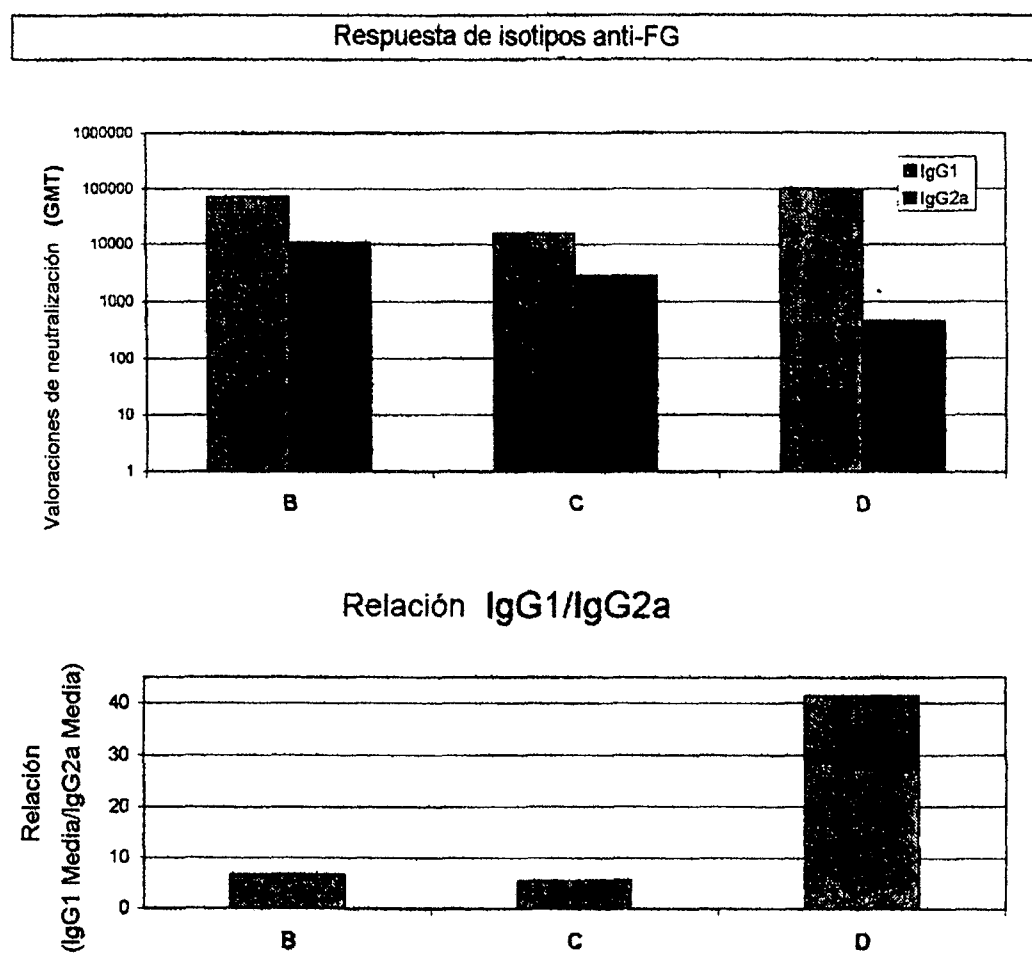
Group 7 : RSV IN (Lote 14)
Group 8 : RSV IN (Lote 15e)
Group 9 : SBAS 4

Fig 5



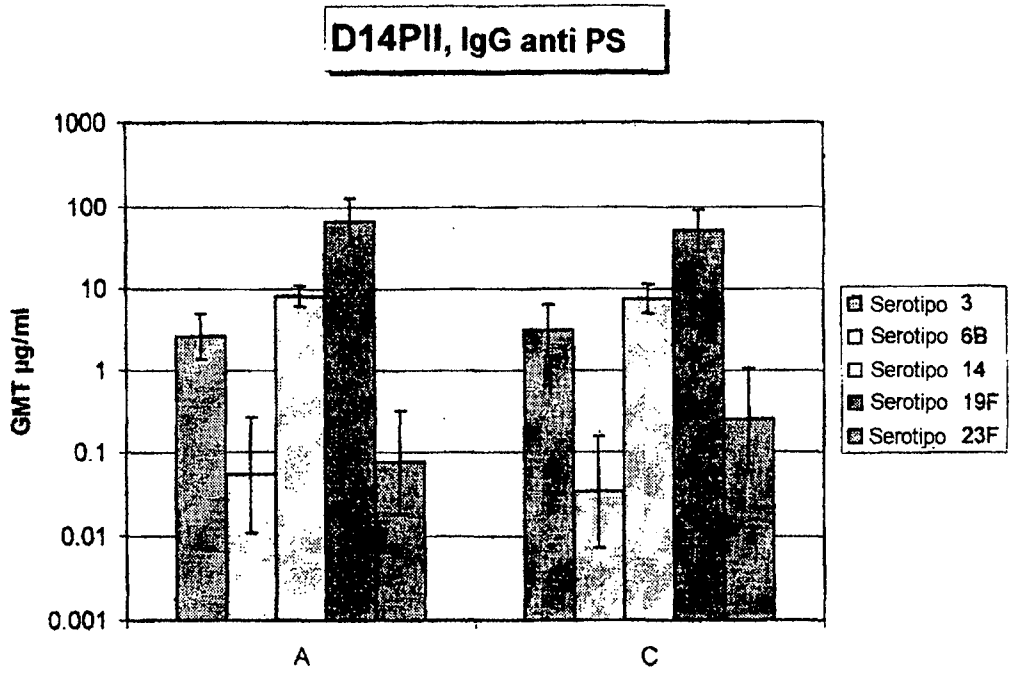
¡Error! Marcador no definido.

Fig 6



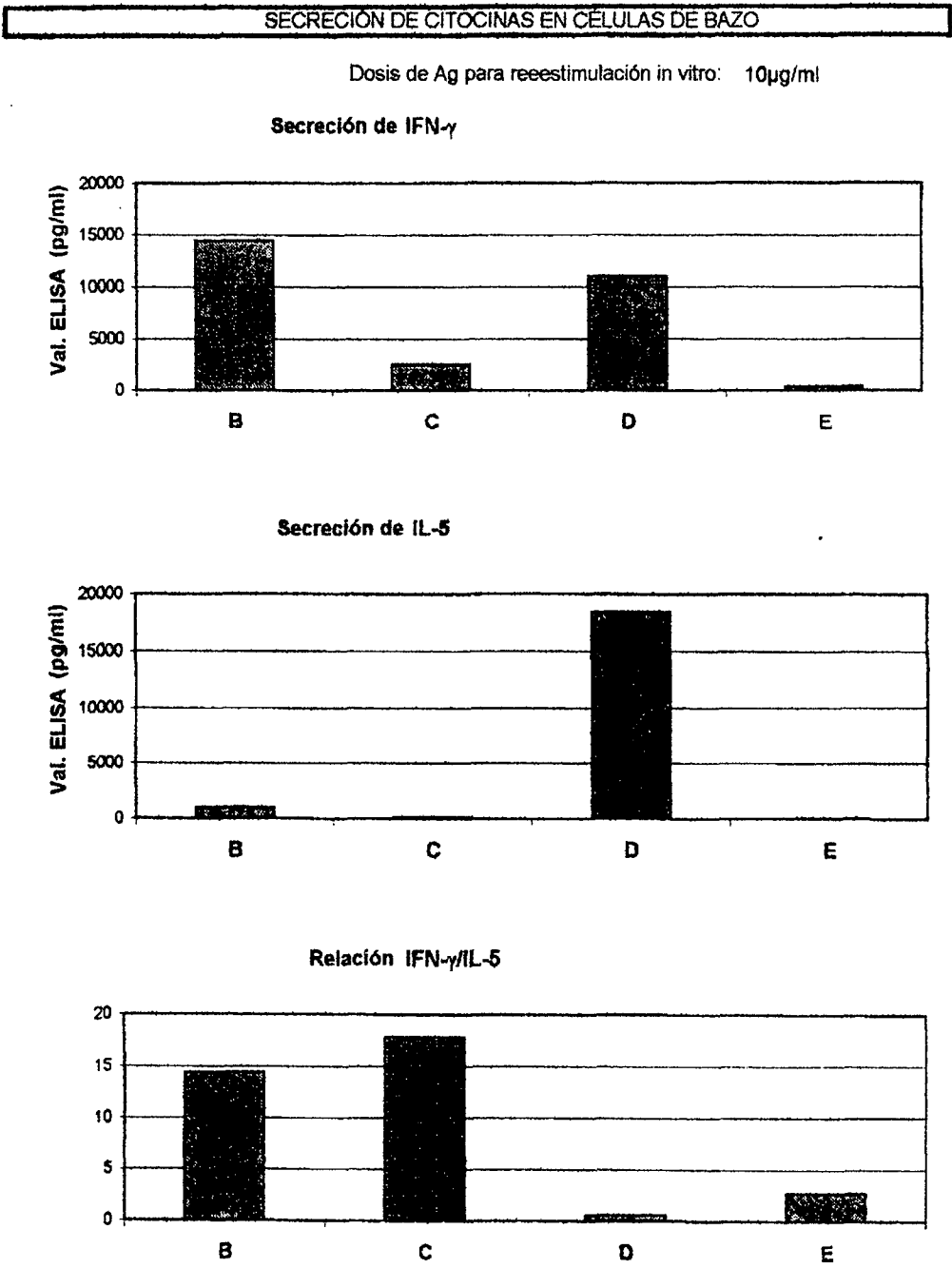
¡Error! Marcador no definido.

Fig 7



¡Error! Marcador no definido.

Fig 8



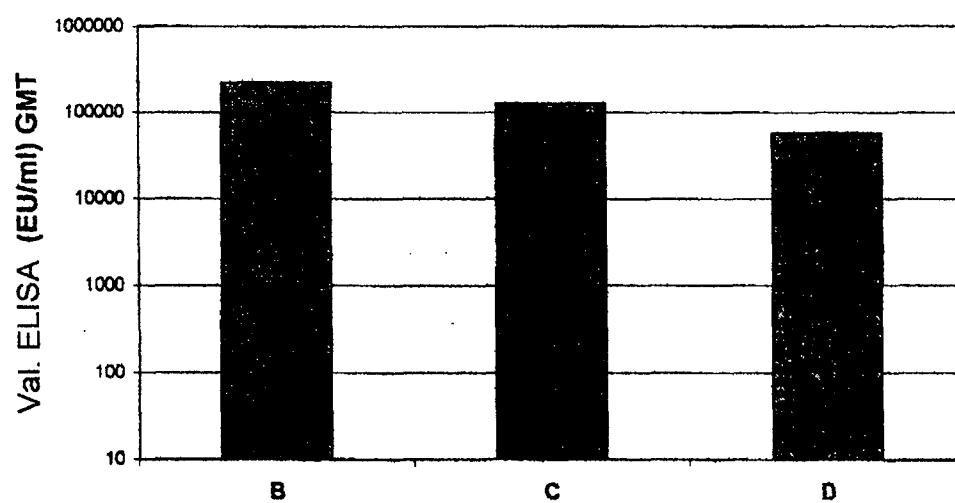
¡Error! Marcador no definido.

B45180

79

Fig 9

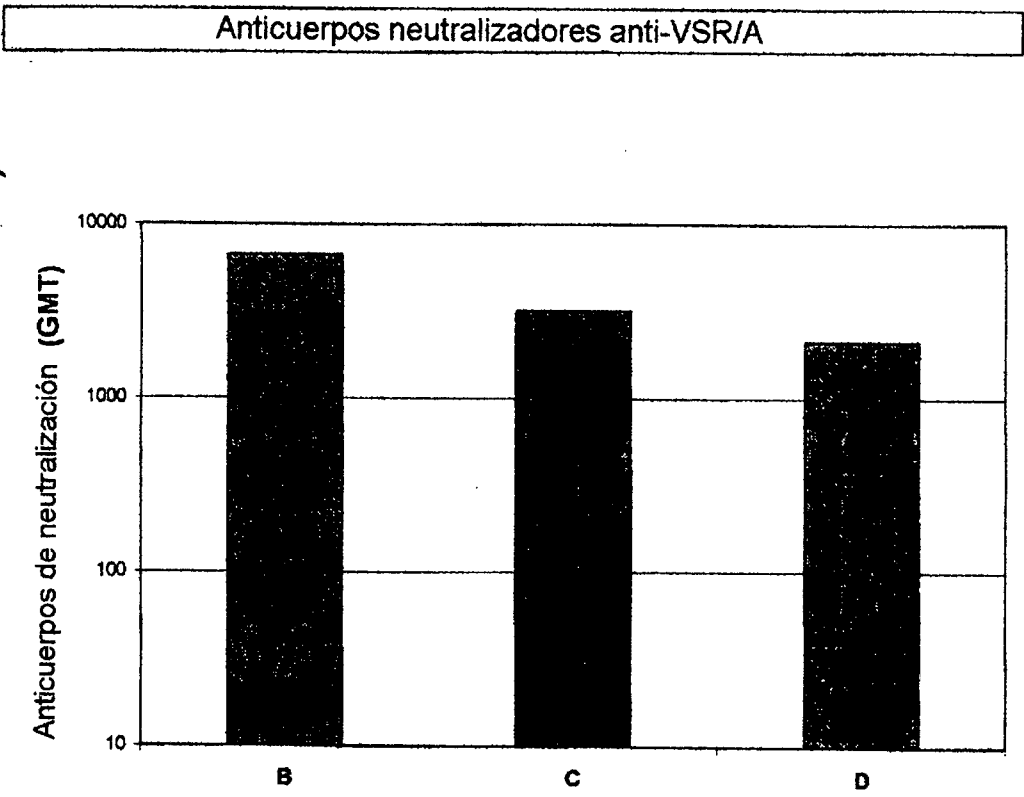
Anticuerpos Ig anti-FG



¡Error! Marcador no definido.

80

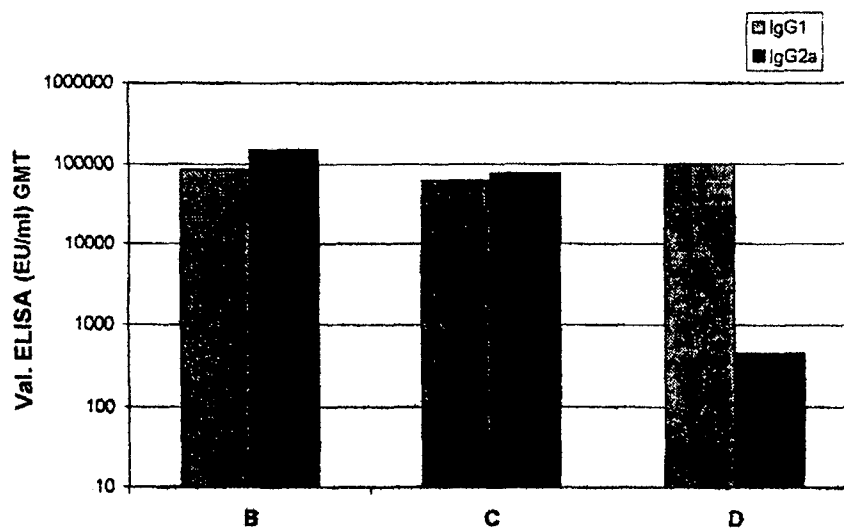
Fig 10



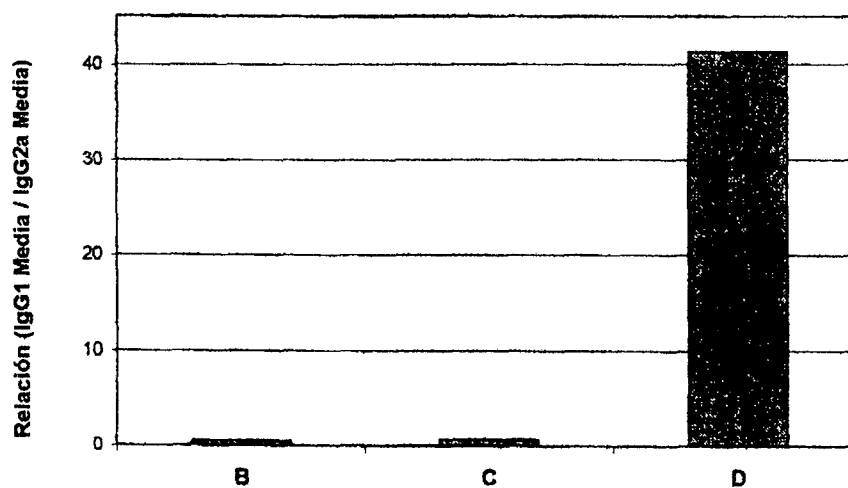
¡Error! Marcador no definido.

Fig 11

Respuesta de isotipos anti-FG

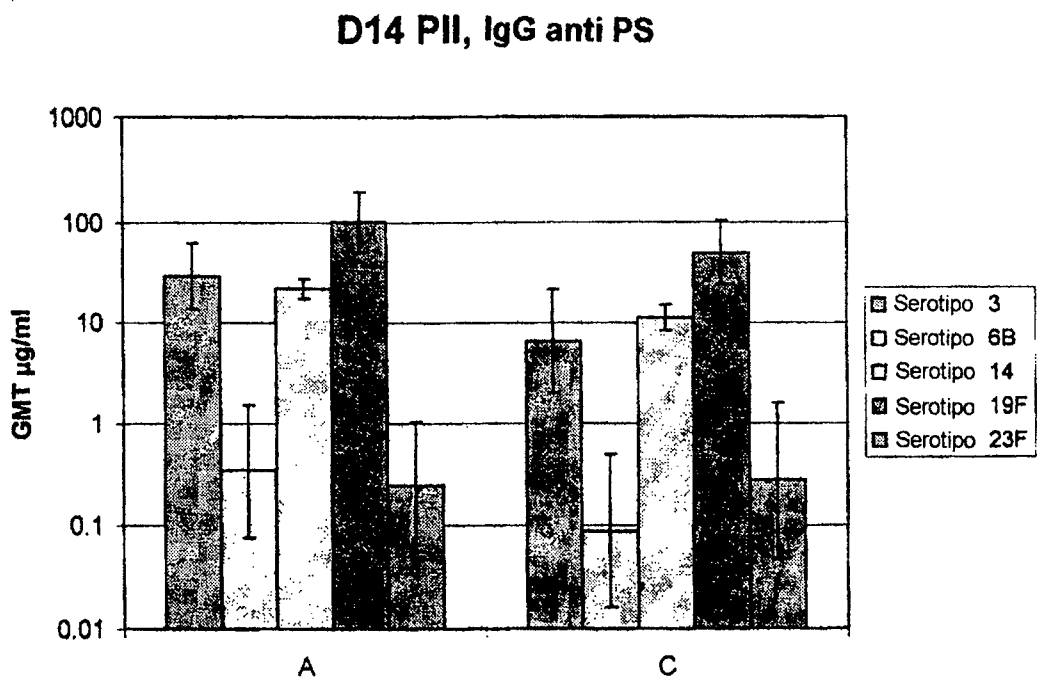


Relación IgG1/IgG2a



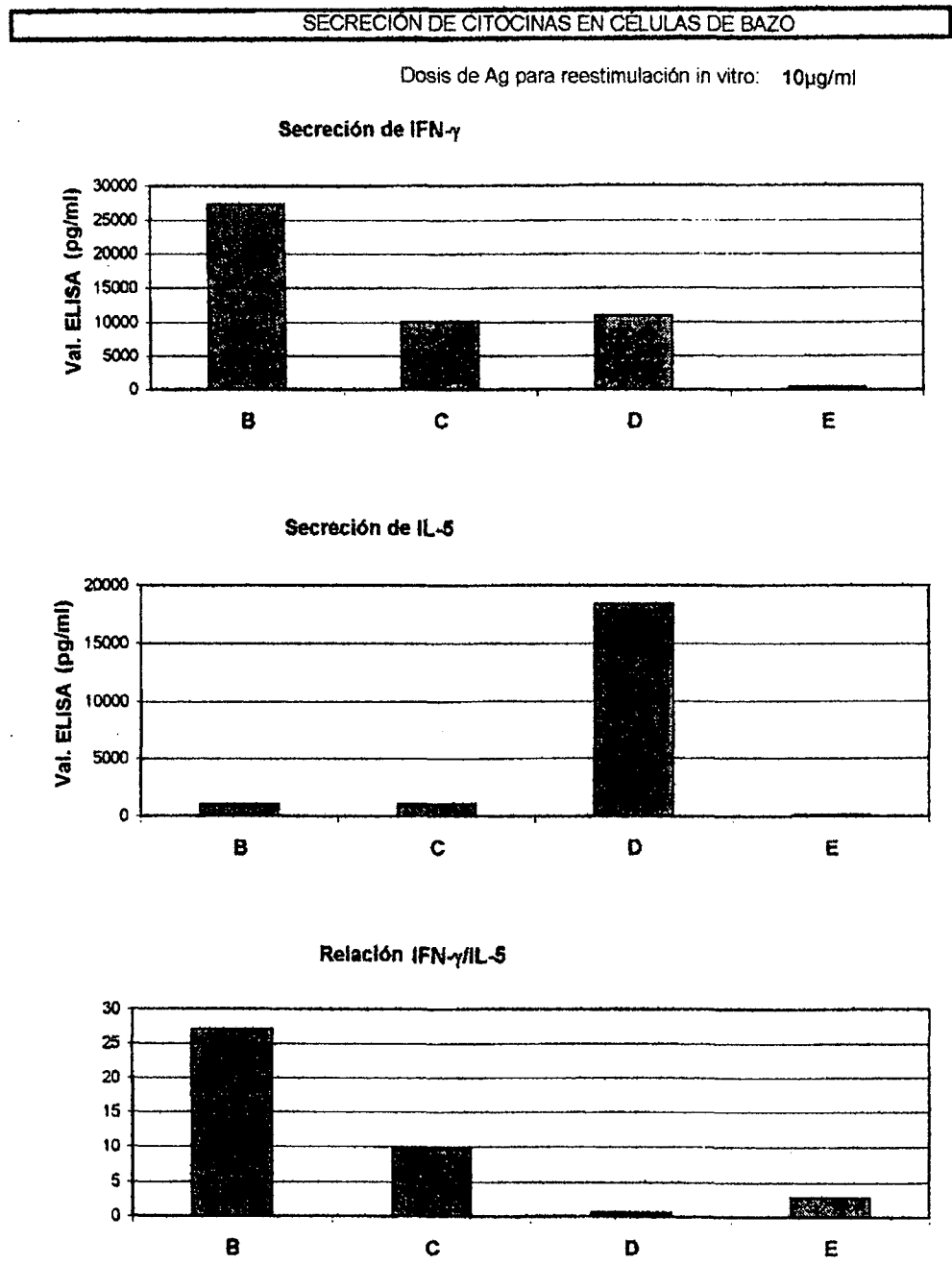
¡Error! Marcador no definido.

Fig 12



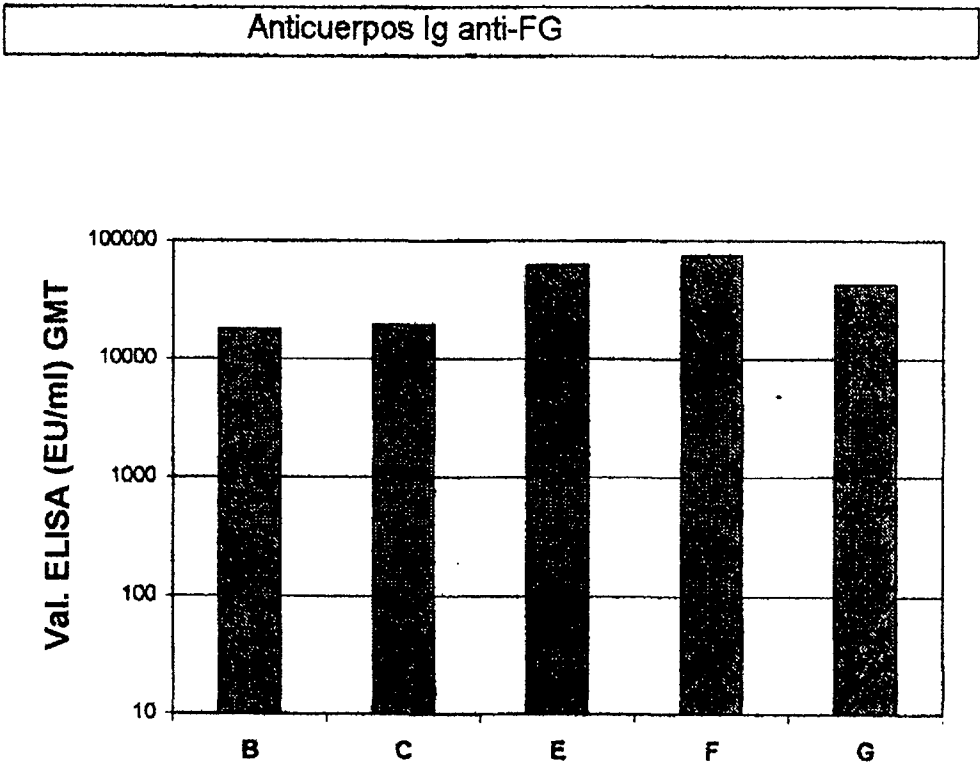
¡Error! Marcador no definido.

Fig 13



¡Error! Marcador no definido.

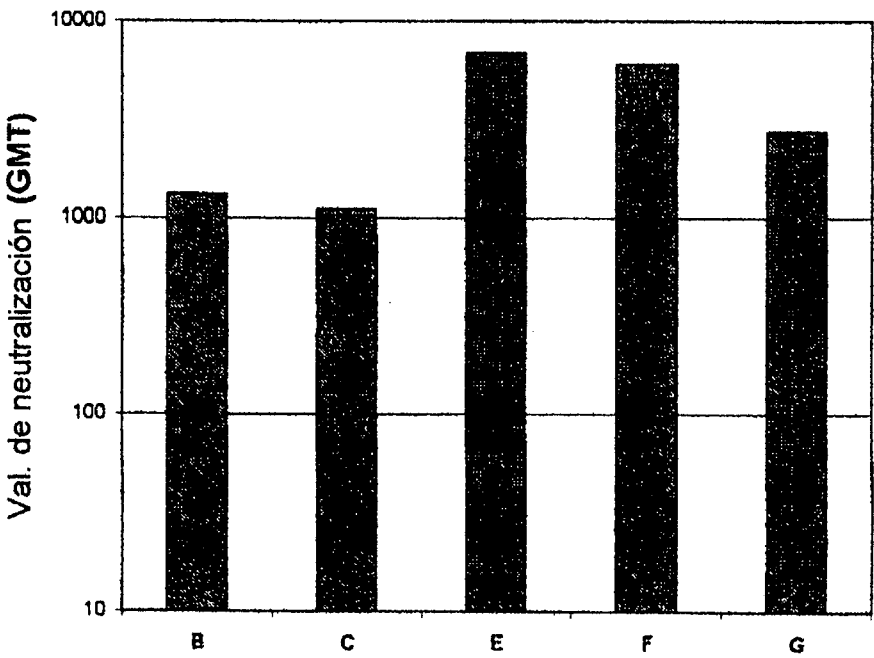
Fig 14



¡Error! Marcador no definido.

Fig 15

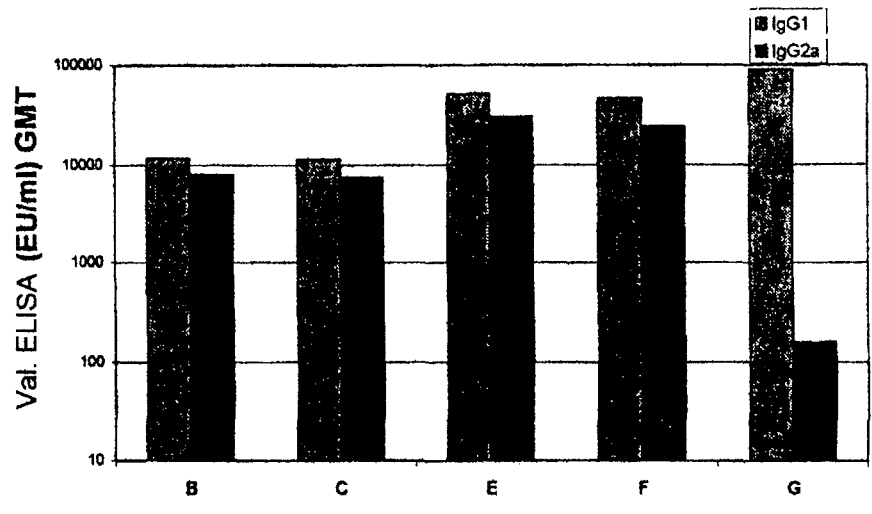
Anticuerpos neutralizadores Anti-VSR/A



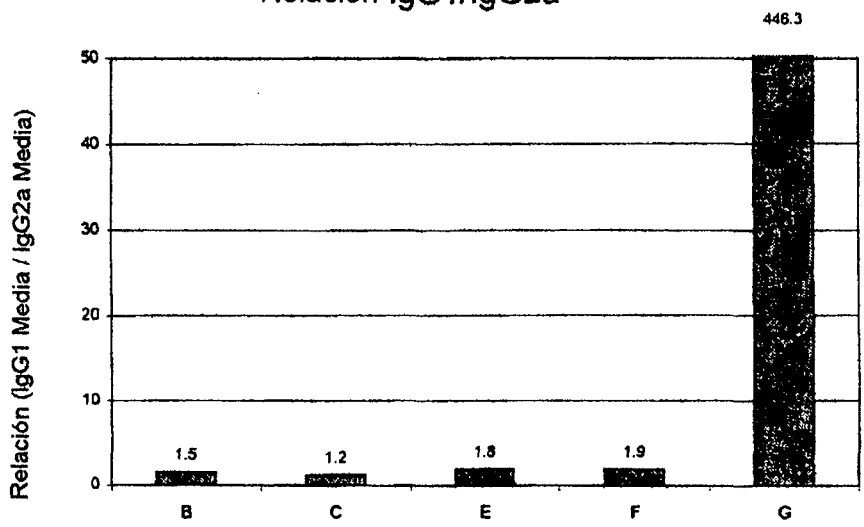
¡Error! Marcador no definido.

Fig 16

Respuesta de isotipos anti-FG



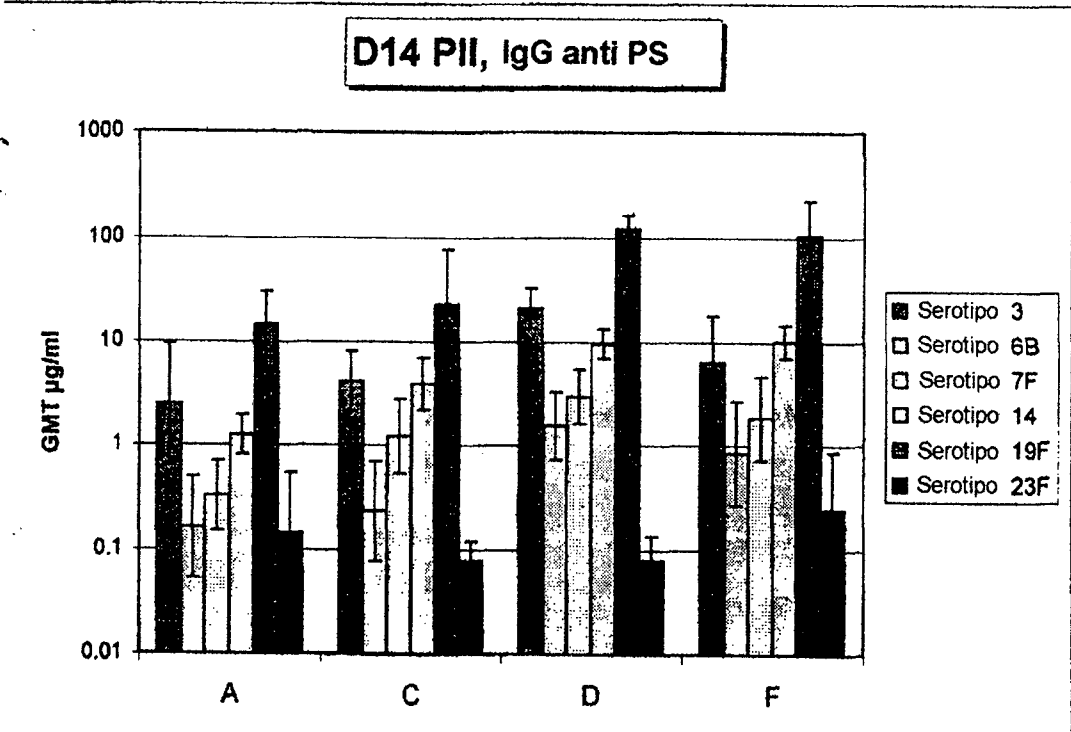
Relación IgG1/IgG2a



¡Error! Marcador no definido.

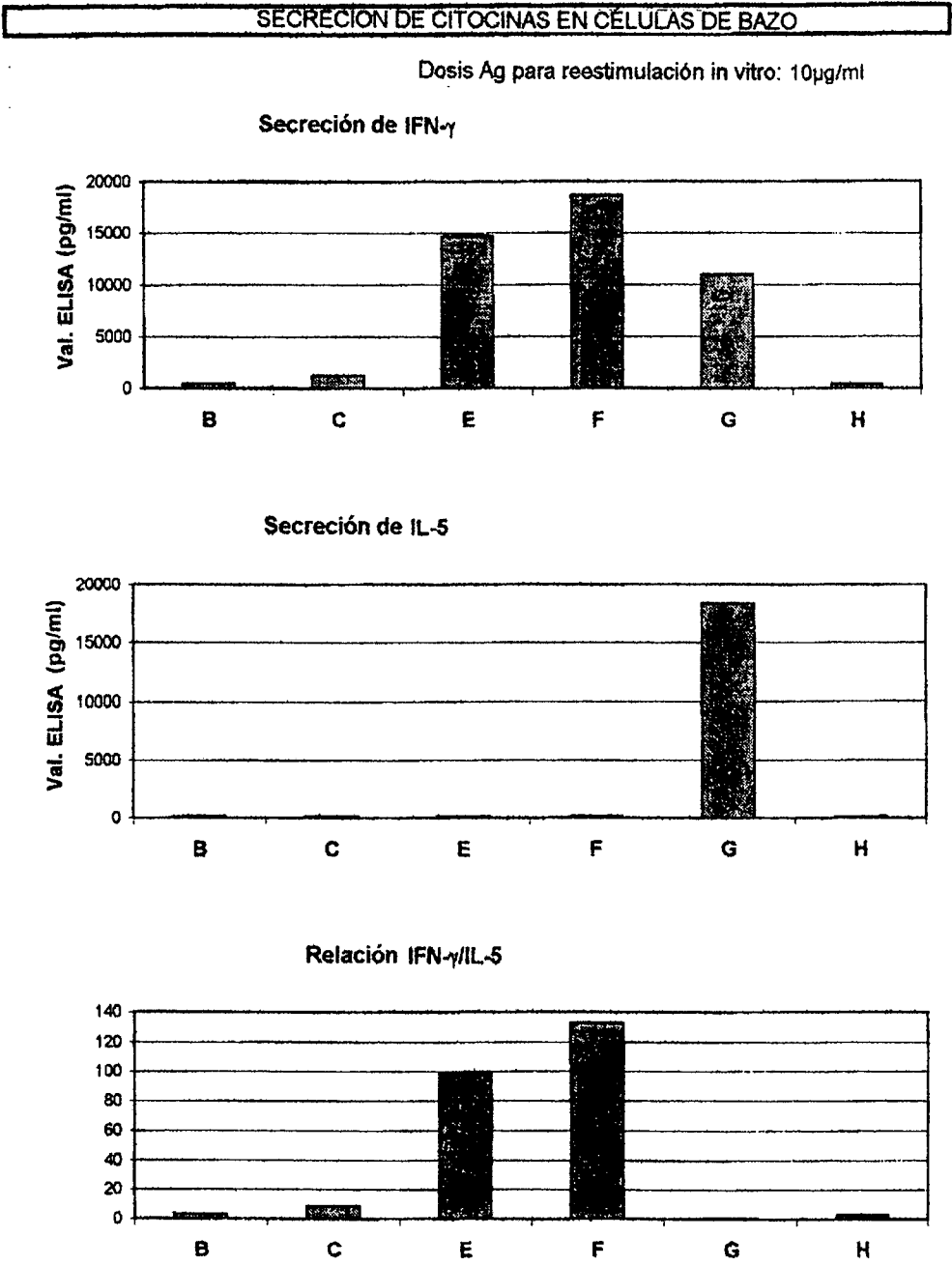
62

Fig 17



¡Error! Marcador no definido.

Fig 18



¡Error! Marcador no definido.

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

89

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN:

(71) SOLICITANTE:

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS s.a.

(30) PRIORIDAD:

(31) No. DE SOLICITUD: 9909077.1

(72) INVENTOR/ES:

(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN:

Abril 20, 1999

Marguerite Deschamps
Craig Antony Joseph Laferrriere

(33) PAÍS:

GRAN BRETAÑA

(74) APODERADO:

GERMAN CASTILLO GRAU

(54) TÍTULO: NUEVAS COMPOSICIONES

(57) RESUMEN.

1. Una composición de vacuna que comprende:

(a) uno o más polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*
conjugados con una proteína o un péptido, o no conjugados;

y

(b) un antígeno de VSR,

junto con un adyuvante que es un estimulador preferente de
una respuesta de tipo Th1.

14. Un procedimiento de preparación de una composición de
vacuna, que comprende mezclar un polisacárido de
Streptococcus pneumoniae conjugado con la proteína D o un
fragmento del mismo, con un antígeno de VSR y un
excipiente farmacéuticamente aceptable.



20

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 00028930 00000000

Folios: 91

Comercio
INDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha (AMD): 2000-04-19 13:57:48

Trámite : 002 PATENTES D I REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- Nombre e identificación del Solicitante []
- Nombre e identificación del Inventor []
- Título o nombre de la Invención []
- Descripción []
- Reivindicaciones 65 []
- Resumen 69 []
- Comprobante de Pago 7 []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario []
- Nombre e identificación del inventor o diseñador []
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse []
- Representación gráfica []
- Comprobante de pago []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha: _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-23-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

29/

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 00-028930.

Fecha: 25 de abril del 2000.

Se certifica que:

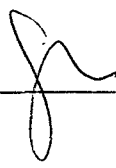
Desde fecha 12 de julio de 1996,
del folio 86.459 al folio 86.464 del
libro de Protocolo N° 298, obra el poder
N° 16.769 conferido por SMITHKLINE
BEECHAMAN BIOLOGICALS S.A.

domiciliado(a) en Rixensart - Bélgica

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

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

Facultad para desistir SI.

Revisado .

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

2000-04-25
430

EXPEDIENTE 00-028930

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

- | | | |
|-----------------|-----------------|--|
| SI [x] | NO [] | NO APLICABLE [] Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a). |
| SI [x] | NO [] | NO APLICABLE [] Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94). |
| SI [x] | NO [] | NO APLICABLE [] Presentó, en forma correcta el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de enero del 2000). |
| SI [x] | NO [] | EXTEMPORANEAMENTE [] Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris. |
| SI [] | NO [x] | NO APLICABLE [] Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional. |
| SI [] | NO [x] | NO APLICABLE [] Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.). |
| SI [] | NO [x] | CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS |

OBSERVACIONES JURIDICAS CONVENIO DE PARIS: En todo caso, deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, **en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses**, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

- | | | |
|---------------|-----------------|--|
| SI [] | NO [X] | Se ajusta a los aspectos FORMALES indicados en la Decisión 344 y por tanto, |
| SI [] | NO [x] | Se recomienda PUBLICAR el extracto correspondiente. |

Santafé de Bogotá, D.C., 25 de abril del 2000.


EXAMINADOR JURIDICO

93

Folio 95

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
1er EXAMEN DE FORMA

2000-06-27

Radicación no 00-28930.
Concepto Técnico no 963. Clasificación Internacional de Patentes A61K 39/09.

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

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

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C., 27 de junio/00

202016
EXAMINADOR TÉCNICO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

CONCEPTO TÉCNICO: 963
EXPEDIENTE: 00028930
IPC: A61K 39/09

Realizado el Primer Examen de Forma se hace la siguiente observación:

1. El título de la invención es muy general, pues "NUEVAS COMPOSICIONES no permite establecer sobre que tipo de compuestos versa la invención. Por tanto, se recomienda que se modifique el título de manera que corresponda con las reivindicaciones de la solicitud, una posibilidad es que dicho título sea "Composiciones que comprenden un antígeno de Streptococcus, un antígeno del virus VSR y un adyuvante estimulador de la respuesta TH1".
2. El término "valente" debe ser explicado pues no es claro si dichas proteínas antigénicas se llaman así o es que el término está asociado con una característica específica de dicho antígeno. Sirvase aclarar este punto pues sin este dato la solicitud no precisa la invención.
3. En consecuencia a lo anterior, sirvase presentar nueva tarjeta temática, nueva tarjeta para el archivo de propietarios y nuevo extracto de publicación.

Santa Fe de Bogotá, 27 de junio de 2000

/202016

EXPEDIENTE 00-028930

AUTO 1166

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor Germán Castillo Grau, como apoderado del solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido

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

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

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los

04 JUL 2000

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C. 06 JUL 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI___ NO___

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA