

Daniela



SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.** 00-28.931-

54. **TITULO** VACUNAS QUE COMPRENDEN UN ANTIGENO DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** A61K 39/155, A61K 39/39

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

DOMICILIO RIXENSART, BELGICA

74. **APODERADO** GERMAN CASTILLO GRAU

22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.** 19 de Abril de 2000.

202099



00 28931

Radicacion : 00028931 00000000

Folios: 59

Fecha (AMD): 2000-04-19 14:00:29

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

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

Bélgica

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, D.C.

Teléfono

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

Marguerite Deschamps

Identificación

Dirección

Rixensart, Bélgica

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

VACUNA

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☒

(33) País Gran Bretaña

Gran Bretaña

(32) Fecha Abril 20, 1999

Junio 28, 1999

(31) No. Solicitud 9909077.1

9915106.0

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

La invención se refiere a una formulación de vacuna que comprende un antígeno del virus respiratorio sincitial (RSV) y un oligonucleótido CpG inmunoestimulante, a procedimientos de preparación de la formulación de vacuna y a su uso en medicina. Pueden incluirse antígenos adicionales para proporcionar nuevas vacunas de combinación para su administración a niños, a adultos y a ancianos.

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 de Bgtá T.P.No. 2978

SOLICITUD DE
PATENTE DE
INVENCION

3

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 Bélgica

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, D.C. Teléfono 2857460

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor(es) Marguerite Deschamps

Identificación _____

Dirección Rixensart, Bélgica

Ciudad _____ Teléfono _____

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención VACUNAS QUE COMPRENDEN UN ANTIGENO DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCITIAL

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

(33) País Gran Bretaña (32) Fecha Abril 20, 1999 (31) No. Solicitud 9909077.1
Gran Bretaña Junio 28, 1999 9915106.0

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

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K39/155, A61K39/39



4

3

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00028931 03000000

Folios: 59

Fecha (AMD): 2000-04-19 14:03:29

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA

NIT : 80

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 25,124
FECHA : ABRIL 19 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

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

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		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

VACUNA

La presente invención se refiere a nuevas formulaciones de vacuna que comprenden un antígeno del virus respiratorio sincitial (RSV) y un oligonucleótido inmuoestimulante que contiene "CpG", a procedimientos para su preparación y a su uso en terapia. Además, la presente invención se refiere a nuevas vacunas de combinación para su administración a niños, a adultos y a ancianos.

El virus respiratorio sincitial humano (RSV) es un miembro de la familia de los virus paramixovirídicos y produce trastornos en el tracto respiratorio inferior, particularmente en niños pequeños y bebés. Informes recientes sugieren que el RSV es un importante patógeno en adultos, particularmente en ancianos.

El RSV es un virus encapsulado con un genoma de ácido ribonucleico (RNA) de cadena negativa no segmentada de 15.222 nucleótidos que codifica 10 RNA mensajeros, codificando cada uno un único polipéptido. Tres de las diez proteínas son proteínas de superficie transmembrana: las proteínas G (unión), F (fusión) y SH. Dos proteínas son proteínas de matriz de virión (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 RSV, designadas como cepa A y B. La caracterización de cepas de estos grupos ha

determinado que las mayores diferencias residen en las proteínas G, mientras que se conservan las proteínas F.

El RSV se manifiesta en brotes estacionales, con picos durante el invierno en climas templados y durante la estación de las lluvias en climas cálidos. En todas las zonas el RSV tiende a tener un patrón regular y predecible y raramente se presenta en competencia con otros patógenos virales respiratorios que se manifiestan por brotes.

El RSV es una importante causa de trastornos en el tracto respiratorio inferior en niños. Se estima que el 40-50% de los niños hospitalizados con bronquiolitis y el 25% de los niños hospitalizados con neumonía se hospitalizan como resultado directo de infecciones por RSV. La infección primaria por RSV se manifiesta normalmente en niños menores de un año de edad, el 95% de los niños tienen evidencias serológicas de pasadas infecciones a los dos años de edad y el 100% de la población las tienen de adultos.

En bebés y niños la infección progresa desde el tracto respiratorio superior al inferior en aproximadamente el 40% de los casos y el cuadro clínico es de bronquiolitis o neumonía. Los niños de dos a seis meses de edad son los que tienen mayor riesgo de desarrollar manifestaciones graves de la infección por RSV (principalmente fallo respiratorio), sin embargo, los niños de cualquier edad con trastornos cardíacos o pulmonares subyacentes, niños

prematureros y niños inmunocomprometidos también tienen riesgo de complicaciones graves.

La reinfección sintomática tiene lugar a lo largo de toda la vida y ha hecho cada vez más evidente que el RSV es un patógeno importante también para adultos, especialmente para ancianos. La infección por RSV está casi seguramente infradiagnosticada en adultos, en parte porque se considera una infección infantil. Consiguientemente, no se buscan evidencias del virus en adultos para explicar trastornos respiratorios. Además, el RSV es difícil de identificar en secreciones nasales de individuos que tienen algún grado de inmunidad parcial frente al virus, como es el caso de la mayoría de los adultos. Los adultos desde jóvenes a de mediana edad desarrollan típicamente un síndrome parecido al resfriado cuando se infectan por RSV. Los individuos ancianos pueden desarrollar un síndrome respiratorio prolongado que es virtualmente indistinguible de la gripe, con síntomas en el sistema respiratorio superior que pueden estar acompañados por implicación del tracto respiratorio inferior, incluyendo neumonía. Las poblaciones de ancianos institucionalizadas son especialmente preocupantes, ya que comprenden un gran número de individuos susceptibles agrupados. La extensión de la enfermedad a través de dicha población, muchos de los cuales tienen problemas médicos múltiples que pueden

X
8

predisponerles a un transcurso más grave de la enfermedad,
es difícil de controlar. La morbilidad y mortalidad pueden
ser considerables: se ha informado de neumonía en el 33 a
67% de los casos, y se ha informado de tasas de mortalidad
5 de 5 a 20%.

Una serie de estudios han evaluado la contribución de
la infección por RSV a los trastornos respiratorios y la
mortalidad en sanatorios. Se ha informado de tasas de
infección por RSV en sanatorios del 9% en un sanatorio en
10 Francia, de los cuales el 6% fallecieron, del 8% en
Carolina del Sur, del 27% en Rochester de los cuales el 5%
fallecieron, y del 21% en Los Angeles. Finalmente, los
informes de los estudios recientes que evalúan el impacto
de la infección por RSV como causa de hospitalización en
15 adultos y en ancianos sanos residentes en comunidades
apuntan también a un papel importante de la infección por
RSV en trastornos graves del tracto respiratorio inferior
en estas poblaciones. Dowell identificó al RSV como uno de
los cuatro patógenos que causan trastornos graves del
20 tracto respiratorio inferior, con resultado de
hospitalización, en adultos. Falsey demostró que las
infecciones graves por RSV en ancianos no están limitadas
a los sanatorios o situaciones de brotes. Es más, la
infección por RSV es una causa predecible de trastornos
25 graves entre pacientes ancianos residentes en comunidad.

4
9

De manera similar a las hospitalizaciones por gripe A, las relacionadas con infecciones por RSV estaban asociadas con una sustancial morbilidad, como demostraron las prolongadas estancias hospitalarias, altas tasas de admisión en
5 cuidados intensivos y altas tasas de respiración asistida.

Tomados en conjunto, estos estudios apuntan a una necesidad médica y económica de una vacuna efectiva que pueda prevenir las complicaciones graves de la infección por RSV en niños, adultos y tanto ancianos residentes en
10 comunidades, como institucionalizados. La vacunación contra el RSV en los 60 con virus enteros inactivados con formalina formulados con alúmina condujo a la exacerbación de la enfermedad en niños expuestos a continuación a la infección por RSV natural. Por lo tanto existe la necesidad
15 de una vacuna segura y efectiva para proporcionar protección contra este patógeno.

El RSV tiene dos glicoproteínas de cubierta, la proteína F con un peso molecular de 68.000 a 70.000 dalton y una glicoproteína G mayor con un peso molecular de 84.000
20 a 90.000 dalton (Collins et al, J. of Virology, vol 49, pág. 572-578 (1984)).

Son conocidas las proteínas de fusión FG, que comprenden típicamente el dominio extracelular de ambas proteínas (documento US 5.194.595 Upjohn).

25 Las preparaciones de vacuna que comprenden estructuras

FG y 3D-MPL se describen en el documento WO 98/18819 (SmithKline Beecham Biologicals S.A).

Los oligonucleótidos inmunoestimulatorios contienen dinucleótidos CpG no metilados ("CpG") y son conocidos (documentos WO 96/02555, EP 468520). CpG es una abreviatura de los motivos dinucleótido citosina-guanina presentes en ácidos nucleicos. Históricamente, se observó que la fracción de DNA de BCG podía ejercer un efecto antitumoral. En estudios adicionales, los oligonucleótidos sintéticos derivados de las secuencias génicas de BCG mostraron ser capaces de inducir efectos inmunoestimulantes (tanto in vitro como in vivo). Los autores de estos estudios concluyeron que ciertas secuencias palindrómicas, que incluyen un motivo CG central, tenían esta actividad. El papel central del motivo CG en la inmunoestimulación fue elucidado posteriormente en una publicación por Krieg, Nature 374, pág. 546, 1995. El análisis detallado ha mostrado que el motivo CG debe estar en cierto contexto de secuencias, y que dichas secuencias son comunes en DNA bacteriano pero raras en DNA de vertebrado.

Actualmente se cree que esta diferencia evolutiva permite al sistema inmune de los vertebrados detectar la presencia de DNA bacteriano (como ocurre durante una infección), conduciendo consiguientemente a la estimulación del sistema inmune. La secuencia inmunoestimuladora,

definida por Krieg, es:

Purina purina CG pirimidina pirimidina y en la que el motivo CG es no metilado. En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos se presenta una secuencia palindrómica.

5 Varios de estos motivos, o como repeticiones de un motivo o como combinación de diferentes motivos, pueden estar presentes en el mismo oligonucleótido. La presencia de una o más de estos oligonucleótidos que contienen secuencias inmunoestimulatorias puede activar diversos subsistemas
10 inmunes, incluyendo las células asesinas naturales (que producen el interferón γ y tienen actividad citolítica) y los macrófagos (Woolridge et al, Vol 89 (n° 8), 1977). Sin embargo, se ha mostrado ahora que otras secuencias que contienen CpG no metilados sin esta secuencia de consenso
15 son inmunomoduladoras.

La presente invención proporciona una preparación de vacuna que comprende un oligonucleótido CpG inmunoestimulatorio y un antígeno RSV.

Preferiblemente el antígeno RSV es una glicoproteína
20 de cubierta o derivado de ésta procedente de, preferiblemente, la cepa A. Más preferiblemente, el antígeno se selecciona entre glicoproteína F, glicoproteína G o una proteína de fusión FG o derivados inmunogénicos de éstas. Como alternativa, el antígeno RSV puede ser por
25 ejemplo el virus inactivado.

12

Los derivados inmunogénicos incluyen típicamente aquellos en que la proteína está desprovista del dominio transmembrana, es decir, F Δ tm, G Δ tm y F Δ tm G Δ tm. Preferiblemente la secuencia señal se suprime de la proteína G. Se prefiere que al menos alrededor del 50%, o al menos alrededor del 80% (secuencia contigua) del dominio extracelular de la proteína F o G esté presente. Los ejemplos particulares incluyen los aminoácidos 1-526 o 1-489 de la proteína F, los aminoácidos 69-298 o las posiciones alternativas 97-279 de la proteína G, y F₁₋₅₂₆G₆₉₋₂₉₈ de la proteína de fusión. Una fusión alternativa comprende los aminoácidos 1-489 de F seguidos de 97-279 de la proteína G.

Los oligonucleótidos preferidos contienen preferiblemente dos o más motivos CpG separados por seis o más nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención tienen típicamente una longitud entre 15-45 nucleótidos y son típicamente desoxinucleótidos. En una realización preferida, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente, un enlace fosforotioato, aunque los enlaces fosfodiéster y otros enlaces internucleótidos se encuentran dentro del alcance de la invención, incluyendo los oligonucleótidos con engarces internucleótidos mixtos.

Los oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes

13

secuencias: todas las secuencias contienen preferiblemente enlaces internucleotídicos de fosforotioato modificado.

WD000 1: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT

WD000 2: TCT CCC AGC GTG CGC CAT

5 WD000 3: ACC GAT AAC GTT GCC GGT GAC G

WD000 7: ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

Los oligonucleótidos CpG utilizados en la presente invención pueden sintetizarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo como el
10 descrito en el documento EP 468520). Convenientemente, dichos oligonucleótidos pueden sintetizarse utilizando un sintetizador automatizado. Los procedimientos para la producción de oligonucleótidos fosforotioatos o fosforoditioatos se describen en los documentos US
15 5.666.153, US 5.278.302 y WO 95/26204.

Cuando CpG y una sal de aluminio, como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (alúmina) están ambos presentes esto activa sinérgicamente el anticuerpo específico del antígeno anti RSV. En particular, dicha
20 combinación coadyuvante activa significativamente los niveles de anticuerpo IgG2a, un marcador de la respuesta Th1. Sin embargo, la combinación coadyuvante de un oligonucleótido CpG y una sal de aluminio permite una respuesta mediada por célula como determina la
25 linfoproliferación específica.

Consiguientemente, en una realización de la invención se proporciona una formulación de vacuna que comprende un antígeno RSV y un oligonucleótido CpG inmunoestimulador en combinación con una sal de aluminio. Preferiblemente la sal de aluminio es hidróxido de aluminio.

Pueden añadirse otros excipientes de vacuna a la formulación para la invención. Los inmunoestimulantes adicionales preferidos incluyen, por ejemplo, coadyuvantes de saponina, como QS21.

En la vacuna de la presente invención, puede utilizarse directamente una disolución acuosa de la(s) proteína(s) para la mezcla con el coadyuvante. Como alternativa, la proteína puede liofilizarse.

Los antígenos de la presente invención pueden expresarse en cualquier huésped adecuado, como células de bacteria, mamífero, insecto, levadura y hongo. El uso de células de insecto como células Sf9 lo describen Du et al, BIO/TECHNOLOGY 12, 1994, 813-818. Preferiblemente las proteínas de la invención se expresan en células de insecto utilizando un bacilovirus recombinante (Wathen et al, J. Gen. Virol. 1989, 70, páginas 2625-2635). Más preferiblemente, sin embargo, las proteínas de la invención se producen en células eucariotas, particularmente en células de ovario de hámster chino (CHO) y células Vero, y se purifican mediante el procedimiento descrito en el

14
15

documento WO 98/18819 (SmithKline Beecham Biologicals S.A.).

En una realización preferida de la invención el antígeno se produce por expresión en células de mamífero de una secuencia de DNA con uso de codón de mamífero optimizado. La optimización del uso del codón implica el reemplazo de al menos un codón no preferido o menos preferido de un gen natural que codifica una proteína por un codón preferido que codifique el mismo aminoácido. Los genes de mamífero expresados a niveles altos típicamente tienen C o G en su posición degenerada (tercera base del codón), mientras que el RSV u otros códones de la proteína de RSV pueden cambiarse para ajustarse mejor al uso celular mamífero, es decir, el (o los) de mayor prevalencia como se muestra a continuación.

16

5

Ala: GCC	Cys: TGC	His: CAC	Met: ATG	Thr: ACC
Arg: CGC AGG CGG	Gln: CAG	Ile: ATC	Phe: TTC	Trp: TGG
Asn: AAC	Glu: GAG	Leu: ATC	Pro: CCC	Tyr: TAC
Asp: GAC	Gly: GGC	Lys: AAG	Ser: AGC TCC	Val: GTG

Cada aminoácido codificado por uno de estos códones se considera entonces optimizado.

10

El antígeno según la invención puede expresarse como una proteína de fusión. Por ejemplo, el antígeno puede ser una fusión heteroquimérica de una cubierta de un antígeno RSV o un derivado inmunomgénico de ésta con un antígeno de un patógeno diferente. Los ejemplos particulares incluyen fusiones con antígenos de cubierta o derivados inmunogénicos de otros paramixovirus, por ejemplo los virus de la paragripe (PIV-1, 2 y 3) o virus de las paperas o virus del sarampión.

15

20

La invención proporciona también el DNA que codifica dicha proteína o derivado inmunogénico de ésta en la que el uso del codón de uno o más ácidos nucleicos se ha optimizado sustancialmente y un procedimiento para la expresión del citado DNA en una célula CHO o de insecto.

17

Los antígenos también pueden construirse utilizando un microorganismo vivo recombinante, como un virus o bacteria como sistema de expresión. El gen de interés puede insertarse en el genoma de un virus o bacteria recombinante vivo. La inoculación e infección in vivo con este vector vivo conducirá a la expresión in vivo del antígeno y a la inducción de respuestas inmune. Los virus y bacterias utilizados con este propósito son por ejemplo: virus de la viruela (por ejemplo vacunas, viruela de aves de corral, viruela de canario), alfavirus (virus Sindbis, virus del bosque Semliki, virus de la encefalopatía equina venezolana), adenovirus, virus adenoasociados, picornavirus (virus de la polio, rinovirus), herpesvirus (virus de la varicela zóster, etc.), Listeria, Salmonella, Shigella, BCG. Estos virus y bacterias pueden ser virulentos o atenuados de diversas maneras para obtener vacunas vivas. Dichas vacunas vivas, al formularse con oligonucleótidos CpG, forman también parte de la invención.

La invención se refiere también a procedimientos para la construcción y expresión de las proteínas de la invención y a procedimientos para la optimización del uso del codón de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas.

Los antígenos de la presente invención pueden presentarse también como un ácido nucleico que codifica el

A
18

citado antígeno y formulado con un oligonucléotido CpG.

Los antígenos de la presente invención no son necesariamente antígenos de subunidades recombinantes. El antígeno RSV puede estar por ejemplo en forma de un virus
5 completo inactivado. Dicho virus inactivado puede producirse a partir de RSV que se ha atenuado, por ejemplo por subcultivo o por manipulación genética. Puede utilizarse un RSV recombinante que se ha manipulado por ingeniería genética para contener un antígeno de cubierta
10 de una cepa diferente de RSV, por ejemplo una base de cepa A de RSV con una proteína de cubierta B, opcionalmente atenuada.

La preparación de vacuna se describe generalmente en New Trends and Developements in Vaccines, editado por
15 Voller et al, University Park Press, Baltimore, Maryland, EE.UU 1978 y en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, editado por Powell y Newman, Plenum Press, Nueva York, 1995. La encapsulación con liposomas se describe, por ejemplo, en Fullerton, patente estadounidense 4.235.877.
20 La conjugación de proteínas a macromoléculas la describe, por ejemplo, Likhite, patente estadounidense 4.372.945 y Armor et al, patente estadounidense 4.474.757.

La cantidad de proteína en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta
25 inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos

7/8
19

B45185

15

significativos en vacunas típicas. Dicha cantidad variará dependiendo del inmunógeno específico que se emplee y de cómo se presente. Generalmente, se espera que cada dosis comprenda 1-1000 μg de proteína, preferiblemente 2-1000 μg ,
5 más preferiblemente 5-50 μg . La cantidad óptima para una vacuna particular puede determinarse mediante estudios estándares que implican la observación de las respuestas inmune apropiadas en los sujetos. A continuación de la vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o más
10 inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas.

Adecuadamente, el CpG estará presente en el intervalo de 100 μg por dosis a 3000 μg , preferiblemente 250-750 μg , como 500 μg por dosis.

Adecuadamente, la vacuna utilizada en la presente
15 invención puede comprender un vehículo como una sal de aluminio, por ejemplo hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), fosfato de aluminio o fosfato sulfato de aluminio (alúmina), o una emulsión no tóxica de aceite en agua o mezcla de éstos.

20 Si se utiliza una sal de aluminio (preferiblemente hidróxido de aluminio) como vehículo, está generalmente presente en el intervalo de 50 a 100 μg (humanos: 500 a 1000 μg), preferiblemente a 500 μg por dosis.

25 Las emulsiones no tóxicas de aceite en agua contienen preferiblemente un aceite no tóxico, por ejemplo escualeno,

19
20

B45185

16

y un emulsionador como monooleato de polisorbitano (Tween 80), en un vehículo acuoso como suero salino tamponado con fosfato.

5 Si se desea, la vacuna utilizada en la presente invención puede comprender un coadyuvante adicional, preferiblemente una saponina como QS21, como describe por ejemplo el documento WO 95/17210, opcionalmente en presencia de un esteroide, como colesterol, como describe por ejemplo el documento PCT/EP96/01464.

10 Si se desea, pueden añadirse otros antígenos, en cualquier orden conveniente, para proporcionar composiciones de vacuna multivalente como las descritas a continuación en la presente.

15 En un aspecto preferido la formulación de vacuna de la invención comprende adicionalmente un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.

20 *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria gram positiva responsable de una considerable morbilidad y mortalidad, particularmente en jóvenes y ancianos. La colonización expansiva del tracto respiratorio y oído medio, especialmente en niños pequeños, es la causa simple más común de visitas hospitalarias en los Estados Unidos. La bacteria puede hacerse invasiva, infectando la parte inferior de los pulmones y causando neumonía. La tasa de
25 neumonía pneumocócica en los Estados Unidos para personas

21

mayores de 60 años de edad se estima que es de 3 a 8 por 100.000. En el 20% de los casos conduce a bacteremia y a otras manifestaciones como meningitis, con una tasa de mortalidad cercana al 30%, incluso con tratamiento antibiótico. Existen 90 serotipos conocidos de *Streptococcus pneumoniae* que se han determinado por las estructuras de los polisacáridos capsulares que rodean la bacteria, y este es su principal factor de virulencia.

Se conoce una vacuna pneumocócica de 17 valencias (Moniarix), basada en los polisacáridos purificados de los serotipos pneumocócicos más habitualmente implicados en los trastornos invasivos. El procedimiento de purificación de estos polisacáridos se describió en la patente europea 7253 B1. Los ensayos de eficacia de vacuna con vacunas de menores valencias demostraron una eficacia del 70 al 90% con respecto a los serotipos presentes en la combinación. Los estudios de casos controlados en los Estados Unidos en personas mayores de 55 años utilizando una vacuna de 14 valencias demostraron un 70% de eficacia (Mills y Rhoads 1996). La inclusión de polisacáridos adicionales (para hacer una vacuna pneumocócica de 23 valencias) se aceptó sobre la base de una adecuada respuesta serológica, incluso aunque faltaban datos sobre la eficacia clínica (Brown 1995).

Los polisacáridos pneumocócicos pueden hacerse más

At
22

inmunogénicos mediante acoplamiento químico a vehículos proteínas, y se están realizando ensayos de eficacia clínica para verificar este concepto para la eficacia en la prevención de otitis media.

5 Existen dos procedimientos de conjugación utilizados generalmente para la producción de estructuras de polisacáridos inmunogénicos: (1) la conjugación directa de carbohidrato y proteína, y (2) la conjugación indirecta de carbohidrato y proteína a través de un engarce bifuncional
10 o reactivo espaciador. Generalmente, tanto la conjugación directa como la indirecta requieren la activación química del resto carbohidrato antes de la derivación. Véanse por ejemplo los documentos US 5.651.971 y Dick & Beurret, "Glycoconjugates of Bacterial Carbohydrate Antigens",
15 Conjugate Vaccines, J.M. Cruse & R.E. Lewis (Eds). vol. 10, 48-114 (1989).

Típicamente, el componente *Streptococcus pneumoniae* en una vacuna de la presente invención comprenderá antígenos polisacárido (preferiblemente conjugados), en los
20 que los polisacáridos deriven de al menos cuatro serotipos de neumococos. Preferiblemente los cuatro serotipos incluirán 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,
25 19F y 23F. Aún más preferiblemente, se incluyen al menos

23

B45185

19

11 serotipos en la composición, por ejemplo la composición en una realización incluye polisacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (preferiblemente conjugados). En otra realización preferida de la invención se incluyen al menos 13 antígenos polisacáridos (preferiblemente conjugados), aunque también se contemplan en la invención más antígenos polisacáridos, por ejemplo 23 valencias (como las de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F). Para la vacunación a ancianos (por ejemplo para la prevención de neumonía) es ventajoso incluir los serotipos 8 y 12F (y más preferiblemente también 15 y 22) con la composición antigénica de 11 valencias descrita anteriormente, para formar una vacuna de 15 valencias, aunque para niños (en los que la otitis media es más preocupante) se incluyen ventajosamente los serotipos 6A y 19A para formar una vacuna de 13 valencias.

En otro aspecto preferido, la composición de vacuna de la invención comprende adicionalmente un antígeno estreptococo del grupo B.

Entre los niños, los estreptococos del grupo B (GBS) son la causa principal de infecciones bacterianas con riesgo para la vida, por ejemplo neumonía y meningitis. Además GBS ha surgido como un importante patógeno en

24

adultos, más especialmente en pacientes ancianos o pacientes con trastornos crónicos subyacentes.

Todas las cepas de GBS expresan una cápsula de polisacárido, Entre los nueve serotipos capsulares
5 identificados, las cepas de los cuatro serotipos clásicos (Ia, Ib, II y III) son las responsables de la mayoría de infecciones neonatales invasivas. Aproximadamente el 90% de estas cepas expresan o Rib o alfa, dos miembros de la misma familia de proteínas de superficie celular de
10 estreptococos, y se ha mostrado que confieren inmunidad protectora frente a GBS en modelos animales.

Opcionalmente, la composición de vacuna de la invención comprende además uno o más de una serie de antígenos tales como un antígeno contra el virus de la
15 gripe o PIV-3.

Para hacer comprender mejor esta invención, se presentan los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen fines ilustrativos tan solo, y no se supone que limiten el alcance de la invención de ninguna manera.

25

EJEMPLOS**EJEMPLOS 1- Estudios de RSV formulado con oligonucleótidos que contienen CpG****1. Formulaciones:**

- 5 Se expresó el antígeno FG en células CHO y se purificó según el documento WO 98/18819.

1.1. Formulaciones basadas en CpG o MPL

10 Cuando fue necesario se diluyó $Al(OH)_3$ en H_2O antes de la adsorción del antígeno FG ($2\mu g$) durante 30 minutos. A continuación, se añadió MPL o CpG y se incubó durante 30 minutos. Las formulaciones se tamponaron entonces con PO_4^- /NaCl concentrado diez veces, pH 6,8. Se añadió tiomersal a 1 mg/ml o fenoxi a 5 mg/ml como conservante.

15

Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación. Las formulaciones se prepararon simultáneamente para las dos inyecciones con una maduración de 12 días de las formulaciones finalizadas antes de la primera inyección.

20

1.2. Composición de los constituyentes de la formulación

25

5

COMPONENTE	CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	TAMPON
FG	484	PO_4/NaCl 10/150 mM pH 6,8
MPL	1019	H_2O
CpG	5000	H_2O
AlPO_4	1000	NaCl 150 mM, pH 6,1
Al(OH)_3	10380	H_2O

10

15

2. Protocolo de inmunización:

Se inmunizaron 9 grupos de 10 ratones por diferentes vías (50 μl) los días 0 y 28 con diversas formulaciones (véase Tabla 1). Los grupos 8 se inmunizaron con RSV vivo por vía intranasal (60 μl). Se obtuvieron los sueros los días 28 (28 días después de I) y 42 (14 días después de II). El día 42 se tomaron células de bazo de 5 ratones de todos los grupos para análisis de CMI.

20

3. Respuesta humoral:

3.1. Anticuerpos anti-FG:

Se realizaron todos los resultados humorales para 10 ratones/grupo para las valoraciones anti FG (respuestas individuales excepto para los grupos 6, 7 y 9 y los resultados celulares se presentaron para 5 ratones/grupo).

46
27

B45185

23

Se obtuvieron los sueros individuales 28 días después de la primera inmunización y 14 días después de la segunda inmunización, y se ensayaron la presencia de anticuerpos Ig específicos de FG y su distribución de isotipos (IgG2a, 5 IgG1).

El protocolo de ensayo fue como sigue: recubrimiento durante la noche a 4°C con 50 μ l de FG 54/023 purificada (1 μ g/ml) por pocillo, saturación durante 1 hora a 37°C, 10 incubación con sueros durante 1 hora 30 minutos a 37°C, incubación con biotina Ig anti-ratón 1/1500 (o biotina IgG1, IgG2a 1/1000) durante 1 hora 30 minutos a 37°C, incubación con estreptoperoxidasa 1/2500 durante 30 minutos a 37°C, incubación con OPDA Sigma durante 15 minutos a 15 temperatura ambiente, paro con H₂SO₄ 2 N.

Se controló la OD a 490 nm y se determinaron las valoraciones por Softmaxpro (ecuación de 4 parámetros) referido a una curva estándar y expresado en UE/ml.

20

En los sueros individuales obtenidos 14 días después de II se ensayó la presencia de anticuerpos neutralizantes utilizando el siguiente protocolo: 50 μ l de diluciones dobles de sueros (primera dilución 1/250) se incubaron 25 durante 1 hora a 37°C con 50 μ l de una mezcla que contenía

af
28

B45185

24

500 pfu de RSV-A/Long (lote 14) y complemento de conejillo de indias (dilución 1/25) en una placa de 96 pocillos por duplicado. Se añadieron entonces 100 μ l de una suspensión celular de Hep-2 a 10^5 células/ml a cada pocillo y se
5 incubaron las placas durante 4 días a 37°C en presencia de CO₂ al 5%.

Se aspiraron entonces los sobrenadantes, y después de la adición de 100 μ l de una preparación de WST-1 (dilución
10 1/12,5), se incubaron de nuevo las placas durante 24 horas a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Se controló la OD a 595 nm y se determinaron las valoraciones por regresión lineal ($y = a \cdot \log x + b$), valoración=dilución de suero que proporciona el 50% de reducción de la OD máxima observada
15 para las células sin infectar.

Los controles en el ensayo incluyeron un conjunto de sueros humanos elegidos al azar (conjunto humano) y Sandoglobulina (lote 069, IgG humana genérica producida por Sandoz).

20

4. Respuesta celular

Se aislaron células de bazo 14 días después de II de los grupos 1-8 y de ratones sin tratar (grupo 9) para su uso como control negativo para el análisis de la respuesta
25 celular específica de FG. Se analizaron en las muestras

29

tanto la linfoproliferación específica de FG como la secreción de citocina (IFN- γ + IL-5).

5 Se evaluó la proliferación después de 96 horas de incubación de 4×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos con 200 μ l de medio que contenía de 10 a 0,03 μ g/ml de FG (diluciones triples). Con la incorporación de 3 H-timidina se midió la proliferación específica de FG siguiendo el protocolo estándar.

10

La inducción de citocina se evaluó después de 96 horas de incubación de $2,5 \times 10^6$ células por pocillo en 24 pocillos con 1 ml de medio que contenía de 10 μ g a 0,01 μ g de FG (diluciones de diez veces). Se recogieron entonces los sobrenadantes para determinar por ELISA la cantidad de IFN- γ e IL-5 inducidos siguiendo el protocolo estándar.

15

RESULTADOS

1. Grupos

20 Nueve grupos recibieron dos inmunizaciones de diversas formulaciones que contenían FG formulado con alúmina 3D-MPL-CpG o CpG-alúmina. El grupo 9 constituye el control negativo para los estudios de CMI. Los grupos 6 y 7 constituyen los controles para la inmunogenicidad que
25 podría inducirse por inmunización de los ratones con tan

sólo los coadyuvantes. Las inmunizaciones con RSV vivo eran un control para la respuesta inmune inducida por la infección natural por RSV IN (grupo 8).

5 2. Respuesta humoral

2.1. Anticuerpos anti-FG

Se realizó el análisis de los anticuerpos Ig anti-FG el día 14 después de la vacunación II. Los resultados muestran (tabla 2) que se observa un claro efecto sinérgico por la
10 combinación de CpG con alúmina, ya que la FG formulada con CpG-alúmina induce dos veces tantos anticuerpos específicos anti-FG como la FG formulada con cada uno de los coadyuvantes por separado. Los resultados muestran también que alúmina-CpG y alúmina-3D-MPL inducen niveles
15 equivalentes de anticuerpo.

El análisis de los perfiles de isotipo muestra que CpG-alúmina induce una proporción IgG1:Ig2a < 1, mientras que las otras tres formulaciones inducen una proporción > 1.
20 CpG y CpG-alúmina inducen valoraciones similares de IgG1 que son dos o tres veces (CpG < CpG-alúmina < SBAS1i) menores que las inducidas por alúmina-3D-MPL y alúmina. CpG-alúmina induce altas valoraciones de IgG2a que son de tres a cinco veces superiores a las inducidas por CpG y
25 alúmina-3D-MPL y de treinta a cincuenta veces superiores

a las inducidas por FG-alúmina. La adición de alúmina a CpG, por lo tanto, parece no afectar las valoraciones de IgG1, sino que más bien aumenta las valoraciones de IgG2a tres veces comparado con FG-CpG, haciendo que la proporción
5 IgG1/IgG2a cambie de >1 a <1 .

3. Respuesta celular:

La linfoproliferación inducida específica de FG muestra la inducción de índices de estimulación equivalentes para CpG-
10 alúmina, 3D-MPL-alúmina y alúmina, excepto para FG CpG. FG CpG, de manera similar a los grupos de coadyuvantes por separado y al grupo de control de ratones sin tratar, no induce ninguna linfoproliferación específica de FG detectable. Como se observó en otros experimentos, el RSV
15 IN vivo no induce una respuesta inmune suficientemente alta como para que el ensayo de linfoproliferación sea capaz de registrarla.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

20 El análisis de anticuerpos muestra que se observa un claro efecto sinérgico lineal con la formulación de FG con CpG y alúmina, comparado con la FG formulada con cualquiera de los coadyuvantes.

25 Basándose en el análisis de isotipos de FG CpG-alúmina, FG

At
32

B45185

28

CpG y FG alúmina-MPL, inducen todos un perfil de Th mixto medido por la inducción de los anticuerpos tanto IgG2a como IgG1. FG alúmina, sin embargo, induce casi exclusivamente anticuerpos IgG1, marcadores de respuesta Th2. Basándose en el nivel de anticuerpos IgG2a inducidos específicos de FG, los resultados sugieren que FG CpG-alúmina induce predominantemente isotipos de anticuerpos Th1, mientras que FG CpG, y en una mayor extensión, FG alúmina-3D-MPL, inducen predominantemente isotipos de anticuerpos Th2. La formulación de FG con ambos CpG y alúmina conduce a un aumento de tres veces la valoración de IgG2a comparado con la FG CpG sola.

El análisis de la respuesta mediada por célula específica de FG sugiere que FG CpG no induce una linfoproliferación detectable. Sin embargo, de manera similar a lo observado para las respuestas de anticuerpo Ig específico de FG, la formulación de FG con ambos CpG y alúmina permite la inducción de una linfoproliferación específica.

20

25

32
33

B45185

29

Tabla 1

Grupos	Antígeno	Coadyuvante	Vía
2	FG (2µg)	CpG	IM
3	FG (2 µg)	CpG alúmina	IM
4	FG (2 µg)	Alúmina MPL	IM
5	FG (2 µg)	Alúmina	IM
6	/	Coadyuvante de control	IM
7	/	CpG (100 µg)	IM
8	RSV vivo (lote 14, 10 ⁵ PFU)		IN
9	ninguno	ninguno	

TABLA 2

Candidato a vacuna	Nº grupo	Análisis del suero de ratones Balb/c inmunizados 14 días después de II (GMT)						
		Ig anti-FG por ELISA	RSV-A neutra	Proporción de neutra por ELISA	Proporción IgG1/IgG2a	IgG1	IgG2a	IgG2b
FG CpG	2	6677			1,97	60139	30604	5121
FG CpG- alúmina	3	12236			0,71	78557	110488	15567
FG SB alúmina-3D-MPL	4	1608022			7,19	178569	24846	17771

34

FG alúmina	5	91568			66,55	161254	2423	617
RSV vivo	8	4623			0,82	1396	1705	823

5 **EJEMPLO 2- Estudios de RSV formulado con oligonucleótidos**
que contienen CpG, junto con antígenos adicionales
(polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*)

1. Procedimiento de formulación

10 Las formulaciones se prepararon 4 días antes de la primera
inyección.

1.1. Formulaciones basadas en Al(OH)₃,

15 Se preadsorbió CpG (50, 10 o 2 µg) sobre Al(OH)₃ como
monómero concentrado en bruto mediante mezcla de los
inmunoestimulantes con la sal de aluminio un día antes de
la formulación final. Se preparó vacuna SP de 11 valencias
no adsorbida, conjugada a proteína D, mediante mezcla de
los 11 componentes conjugados en orden numérico y ajuste
de la concentración a 2 µg/val/ml con NaCl 150 mM. Las
20 formulaciones finales se prepararon mediante mezcla de H₂O
y sal de aluminio, si era necesaria, y CpG preadsorbido.
Después de 5 minutos de incubación se añadieron la vacuna
SP de 11 valencias (0,1 µg/val) y/o FG (2 µg) (FG como en
el ejemplo 1) y se incubaron durante 30 minutos. Se añadió
25 entonces tampón PO₄/NaCl y se incubó durante 5 minutos

294

35

B45185

31

antes de la adición de tiomersal (1 $\mu\text{g/ml}$) que se dejó incubar durante 30 minutos.

1.2. Formulaciones sin Al(OH)_3

5

Se preparó el polisacárido de 11 valencias no adsorbido (PS) mediante mezcla de las 11 valencias en orden numérico y ajuste de la concentración a 2 $\mu\text{g/val/ml}$ con NaCl 150 mM. Las formulaciones finales se prepararon mediante mezcla de 10 H_2O y tampón PO_4/NaCl y las 11 valencias no adsorbidas (0,1 $\mu\text{g/val}$) y/o FG (2 μg). Después de 5 minutos de incubación, se añadió CpG y se incubó durante 30 minutos. Se añadió entonces tiomersal (1 $\mu\text{g/ml}$) y se dejó incubar durante 30 minutos.

15

Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación. Las formulaciones se prepararpn simultáneamente para las dos inyecciones con una maduración de 7 días de las formulaciones finalizadas antes de la 20 primera inyección.

36

2. Composición de los constituyentes de la formulación:

Tabla 3

Componente	Conc. de AG o IMST	Conc. Al+++ (µg/ml)	Tampón
FG	484		PO ₄ /NaCl 10/150 mM pH 6,8
vacuna clínica de 11 valencias no adsorbida			
PS1	144		NaCl 150 mM pH 6,1
PS3	149		NaCl 150 mM pH 6,1
PS4	114		NaCl 150 mM pH 6,1
PS5	135		NaCl 150 mM pH 6,1
PS6b	200		NaCl 150 mM pH 6,1
PS7	168		NaCl 150 mM pH 6,1
PS9	175		NaCl 150 mM pH 6,1
PS14	180		NaCl 150 mM pH 6,1
PS18	137		NaCl 150 mM pH 6,1
PS19	140		NaCl 150 mM pH 6,1
PS23	158		NaCl 150 mM pH 6,1
QS21	2.000		H ₂ O
CpG1826	20.000		H ₂ O
Al(OH) ₃		10.380	H ₂ O

Ab
39

2. Protocolo de inmunización:

Se inmunizaron 19 grupos de 10 ratones por vía intramuscular (100 μ l) los días 0 y 28 con diversas formulaciones (véase tabla 4). Se obtuvieron los sueros los días 42 y 43 (14/15 días después de II). El día 43 se tomaron células de bazo de 5 ratones de los grupos inmunizados con formulaciones que contenían FG, así como de 5 ratones Balb/c sin tratar (grupo 24, no inmunizados).

3. Respuesta humoral

3.1. Anticuerpos anti-FG:

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

Se obtuvieron los sueros individuales 14/15 días después de la segunda inmunización y se ensayó la presencia de anticuerpos Ig específicos de FG y su distribución de isotipo (IgG2a, IgG1).

Los ensayos se realizaron como se describe en el ejemplo 1.

AA
38

3.2. IgG polisacárido anti-pneumocócico

Se midió la IgG murina ante los polisacáridos pneumocócicos de tipos 3, 6B, 7F, 19F y 23F mediante ELISA con un procedimiento adaptado del protocolo CDC. Este
5 protocolo incluye la adición de polisacáridos solubles de la pared celular (CPS) a los sueros para inhibir la medida de anticuerpos CPS. CPS es un ácido teicoico que contiene fosforilcolina común a todos los neumococos. Está presente bajo la cápsula y los anticuerpos frente a él son sólo
10 débilmente protectores. Puesto que CPS está ligado al polisacárido capsular, existe normalmente de 0,5 a 1% de CPS que contamina el polisacárido capsular purificado utilizado para recubrir las placas ELISA. Así, la medida de los anticuerpos CPS puede confundir la interpretación
15 de los resultados de ELISA con respecto al polisacárido capsular.

Se realizó ELISA 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. Se premezclaron los sueros con el
20 equivalente de 500 $\mu\text{g/ml}$ de CPS en sueros sin diluir, y se incubaron durante 30 minutos antes de la adición a la placa ELISA. Se detectó la Ig murina con peroxidasa de IgG (H+L) anti-murina de cabra de Jackson ImmunoLab a una dilución
25 1:5000. Las curvas de valoración se refirieron a los

48

39

B45185

35

anticuerpos monoclonales de murina específicos de polisacáridos de concentración conocida para cada serotipo, utilizando la comparación logarítmica logística con SoftMaxPro. Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron
5 HASP4, PS7/19, PS14/4, PS19/5 y PS23/22 para los tipos 6B, 7F, 14, 19F y 23F, respectivamente.

Para el serotipo 3, se realizó un ELISA similar, excepto que las inmunoplasmas se recubrieron primeramente con
10 seroalbúmina humana metilada (1 μ g/ml en PBS, durante 2 horas a 37°C) para mejorar el recubrimiento de PS3 (2,5 μ g/ml en PBS, durante la noche a 4°C). Se utilizó el anticuerpo monoclonal PS3/6 como referencia estándar.

15 **4. Respuesta celular**

Se aislaron células de bazo 14 días después de II de grupos inmunizados con formulaciones que contenían FG y de ratones sin tratar, como control negativo para el análisis de la respuesta celular específica de FG. Se analizó en las
20 muestras la secreción de ambas citocinas específicas de FG, IFN- γ e IL-5.

Los ensayos se realizaron como se describe en el ejemplo 1.

25

SA

40

RESULTADOS**1. Grupos**

19 grupos (A a S) recibieron dos inmunizaciones de diversas formulaciones que contenían o la vacuna conjugada de 11 valencias o FG o una combinación de ambos antígenos formulada con CpG o CpG-alúmina con un intervalo de dosis de CpG : 50, 10 o 2 μ g. Los grupos A a R representan estas combinaciones. El grupo S, FG alúmina, constituye un control para el análisis anti-RSV. Finalmente, el grupo T constituye el control negativo para el análisis de CMI.

41

TABLA 4

	Gru- pos	Antígeno	Coadyuvante
5	A	Undeca SPN (0,1 µg)	CpG 50 µg
	B	Undeca SPN (0,1 µg)	CpG 10 µg
	C	Undeca SPN (0,1 µg)	CpG 2 µg
	D	FG (2 µg)	CpG 50 µg
	E	FG (2 µg)	CpG 10 µg
10	F	FG (2 µg)	CpG 2 µg
	G	Undeca SPN(0,1 µg)+FG(2 µg)	CpG 50 µg
	H	Undeca SPN(0,1 µg)+FG(2 µg)	CpG 10 µg
	I	Undeca SPN(0,1 µg)+FG(2 µg)	CpG 2 µg
	J	Undeca SPN (0,1 µg)	CpG 50 µg/alúmina 50 µg
15	K	Undeca SPN (0,1 µg)	CpG 10 µg/alúmina 50 µg
	L	Undeca SPN (0,1 µg)	CpG 2 µg/alúmina 50 µg
	M	FG (2 µg)	CpG 50 µg/alúmina 50 µg
	N	FG (2 µg)	CpG 10 µg/alúmina 50 µg
	O	FG (2 µg)	CpG 2 µg/alúmina 50 µg
20	P	Undeca SPN(0,1 µg)+FG(2 µg)	CpG 50 µg/alúmina 50 µg
	Q	Undeca SPN(0,1 µg)+FG(2 µg)	CpG 10 µg/alúmina 50 µg
	R	Undeca SPN(0,1 µg)+FG(2 µg)	CpG 2 µg/alúmina 50 µg
	S	FG (2 µg)	alúmina
	T	ninguno	ninguno

42

2. RESPUESTA HUMORAL

2.1. Anticuerpos anti-FG

Ninguna de las respuestas específicas de FG fueron afectadas por la mezcla con el conjugado polisacárido pneumocócico de 11 valencias. Con fines prácticos, el análisis específico de FG a continuación se describe sólo para las formulaciones FG.

Se realizaron los análisis de los anticuerpos Ig específicos anti-FG los días 14/15 después de la segunda vacunación. Los resultados muestran la inducción de Ab de Ig específica de FG con todas las formulaciones (Figura 1). Para las formulaciones FG CpG, las valoraciones de Ig específica de FG se redujeron al reducir la dosis de CpG (grupos D-F). Las formulaciones basadas en FG CpG-alúmina inducen mayores respuestas de Ab de Ig específicas de FG que las observadas para el grupo FG CpG o FG alúmina, comparadas con la formulada con FG con cualquiera de ellos por separado. Los niveles de Ab inducidos por las formulaciones FG CpG-alúmina no son sensibles a las dosis de CpG ensayadas.

El análisis de los anticuerpos neutralizantes inducidos anti-RSV/A conduce a las mismas conclusiones que para la respuesta de anticuerpo Ig anti-FG (Figura 2).

43

El análisis de las valoraciones de los isotipos individuales IgG1 e IgG2a anti-FG mostró unos perfiles de respuestas de anticuerpo similares a los observados para Ig anti-FG y valoraciones de anticuerpos neutralizantes para las formulaciones FG CpG (Figura 3). Para las formulaciones basadas en FG CpG-alúmina, los perfiles de Ab fueron también similares, excepto porque pudo observarse un pequeño descenso en los anticuerpos IgG2a al reducir la dosis de CpG. Aquí se observa también un efecto sinérgico en la formulación de FG con CpG y alúmina comparado con la FG formulada con CpG o alúmina por separado. Análisis adicionales mostraron que la adición de la vacuna SP de 11 valencias a FG CpG-alúmina o FG CpG no afecta a las respuestas IgG1 e IgG2a.

15

El análisis de la relación de las respuestas de isotipo IgG1/IgG2a indica que cuanto mayor es la dosis de CpG mayor es la cantidad de ambos isotipos, y en particular los anticuerpos IgG2a en cualquiera de las formulaciones ensayadas. En comparación con las formulaciones de CpG, FG alúmina induce niveles mucho menores de anticuerpos IgG2a y niveles mucho mayores de anticuerpos IgG1.

20

2.2. IgG de polisacárido anti-pneumocócico

Para ambas formulaciones de coadyuvantes las valoraciones

25

44

de IgG anti-PS fueron al menos similares en animales a los que se proporcionó el conjugado PS de 11 valencias con FG, comparadas con los animales inmunizados con el conjugado PS de 11 valencias por sí solo (Figura 4). Este resultado demostró que la combinación de conjugados pneumocócicos de PS y antígeno FG de RSV con una formulación con CpG o alúmina-CpG, no reducía o cambiaba la respuesta inmune anti-pneumocócica. Las valoraciones de anticuerpo para los serotipos 7F y 14 incluso mejoraron significativamente en presencia de FG utilizando la formulación de coadyuvante CpG (con 2 μ g y 50 μ g de dosis de CpG).

Las mayores respuestas de anticuerpo se alcanzaron con los serotipos 7F, 14 y 19F (y en una menor extensión con los serotipos 3 y 6B), al administrar la formulación alúmina-CpG más que proporcionando CpG por sí solo en la misma dosis. Utilizando la formulación anterior, 2 μ g de CpG era un coadyuvante tan bueno como 50 μ g de CpG, mientras que se observó una clara respuesta a la dosis en animales a los que se proporcionaron las formulaciones con CpG no adsorbido.

3. RESPUESTA CELULAR

Ninguna de las respuestas específicas de FG fueron afectadas por la mezcla con el conjugado polisacárido

44-
45

pneumocócico de 11 valencias. Con fines prácticos, el análisis específico de FG a continuación se describe sólo para las formulaciones FG. Debido a problemas experimentales no se obtuvieron análisis del grupo G.

5

El análisis de la producción de IL-5 e IFN- γ (Figura 5) muestra que las formulaciones FG CpG inducen IFN- γ y una pequeña cantidad de IL-5. Las formulaciones de FG CpG-alúmina inducen sin embargo cantidades mucho mayores de IFN- γ , independientemente de la dosis de CpG, mientras que la producción de IL-5 parece aumentar al reducir las dosis de CpG. Esto se refleja en la proporción INF- γ /IL-5 por una producción predominante de IFN- γ , marcador de la respuesta Th1, para ambas formulaciones. Sin embargo, las formulaciones FG CpG-alúmina inducen mucho más marcador de Th1 que las formulaciones Fg CpG por sí solas.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El análisis de la Ig específica anti-FG inducida y valoraciones de anticuerpos neutralizantes anti-RSV/A, muestra que la combinación de FG CpG-alúmina y FG CpG con la vacuna conjugada de 11 valencias de *S. pneumoniae* no inhibe la inducción de las respuestas humoral y celular.

Así, la combinación de FG CpG-alúmina o Fg CpG con vacuna

245
46

estreptocócica conjugada de 11 valencias no afecta a la respuesta observada con FG CpG-alúmina o FG CpG, y por lo tanto se mantienen las características de estas formulaciones, por ejemplo la inducción de respuestas de anticuerpos neutralizantes secundarios y de una respuesta Th1 como se mide por la presencia de anticuerpos IgG2a y la inducción de IFN- γ .

Con fines prácticos las conclusiones se definen de la manera siguiente en relación con las formulaciones de FG.

El análisis de la Ig específica anti-FG inducida y valoraciones de anticuerpos neutralizantes anti-RSV/A muestra una inducción dependiente de la dosis de estos anticuerpos para formulaciones de FG CpG que no se observa para formulaciones de FG CpG-alúmina. Además, se observa un claro efecto sinérgico al formular FG con CpG-alúmina comparado con FG formulada con CpG o alúmina por separado.

Basándose en el análisis de serotipo, FG CpG-alúmina, Fg CpG y FG alúmina inducen todos un perfil de Th mixto por la inducción de anticuerpos tanto IgG2a como IgG1. Sin embargo, FG alúmina induce principalmente anticuerpos IgG1, marcador de una respuesta Th2, mientras que Fg CpG y FG CpG-alúmina inducen ambos más IgG2a, marcador de una

46
47

B45185

43

respuesta Th1, que IgG1. Para ambas formulaciones de CpG, cuanto mayor es la dosis de CpG, mayor es la predominancia del marcador de Th1.

- 5 El análisis de la respuesta mediada por células específica inducida sugiere que, de manera similar a lo observado para las respuestas de isotipo Ig específico de FG, ambas formulaciones FG CpG-alúmina y FG CpG inducen IFN- γ , marcador de una respuesta Th1, induciendo FG CpG-alúmina
10 las mayores cantidades.

- Los resultados demostraron que la combinación de conjugado pneumocócico PS y antígeno FG de RSV con una formulación CpG o alúmina-CpG no cambiaba la respuesta inmune anti-
15 pneumocócica. Las valoraciones de anticuerpos de serotipos 7F y 14 incluso mejoraron significativamente en presencia de FG utilizando la formulación coadyuvante CpG. Para varios serotipos las formulaciones alúmina-CpG eran claramente más potentes que el CpG administrado por sí solo
20 a la misma dosis. Utilizando la formulación anterior, 2 μ g de CpG eran un coadyuvante tan bueno como 50 μ g de CpG, mientras que se observó una clara respuesta a la dosis en animales a los que se administró las formulaciones con CpG no adsorbido.

48

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación de vacuna que comprende un antígeno RSV y un oligonucleótido CpG inmuonestimulante.
- 10 2. Una formulación de vacuna como la reivindicada en la reivindicación 1 en la que los antígenos RSV se seleccionan entre el grupo: proteína F o derivado inmunogénico de ésta, proteína G o derivado inmunogénico de ésta o proteína de fusión FG o derivado inmunogénico de ésta, y RSV inactivado.
- 15 3. Una vacuna como la reivindicada en las reivindicaciones 1 o 2, en la que el derivado es un antígeno esencialmente desprovisto de un dominio transmembrana.
- 20 4. Una vacuna como la reivindicada en las reivindicaciones 1 a 3, en la que el derivado es un antígeno en el que al menos un codón no preferido o menos preferido se ha reemplazado por un codón preferido que codifica el mismo aminoácido.

48
49

5. Una formulación de vacuna como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una sal de aluminio o un coadyuvante de saponina.

5

6. Una vacuna como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la que el oligonucleótido comprende dos dinucleótidos CpG.

10

7. Una vacuna como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la que el oligonucleótido CpG tiene una longitud de 15 a 45 nucleótidos.

15

8. Una vacuna como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la que el oligonucleótido CpG comprende al menos un enlace internucleotídico fosforotioato.

20

9. Una vacuna como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la que el oligonucleótido se selecciona entre el grupo:

WD000 1: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT

WD000 2: TCT CCC AGC GTG CGC CAT

25

WD000 3: ACC GAT AAC GTT GCC GGT GAC G

WD000 7: ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

10. Una formulación de vacuna como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la que está presente además un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.
11. Una formulación de vacuna como la reivindicada en la reivindicación 10, en la que el antígeno de *Streptococcus pneumoniae* es el polisacárido capsular.
12. Una formulación de vacuna como la reivindicada en la reivindicación 11, en la que el polisacárido está conjugado a una proteína.
13. Una formulación de vacuna como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que está presente además un antígeno del virus de la gripe.
14. Una formulación de vacuna como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que está presente además un antígeno de *Streptococcus* de grupo B.

51

B45185

47

15. Una formulación de vacuna como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que está presente además un antígeno de PIV-3.

5 (16) Un procedimiento para la prevención o mejora de infección por RSV en un paciente, que comprende la administración a pacientes de una cantidad efectiva de una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

10

17. Una vacuna como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso como un medicamento.

15 18. Un procedimiento de producción de una vacuna como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende la mezcla de un antígeno RSV y un oligonucleótido inmunoestimulante CpG.

5
52

B45185

48

RESUMEN

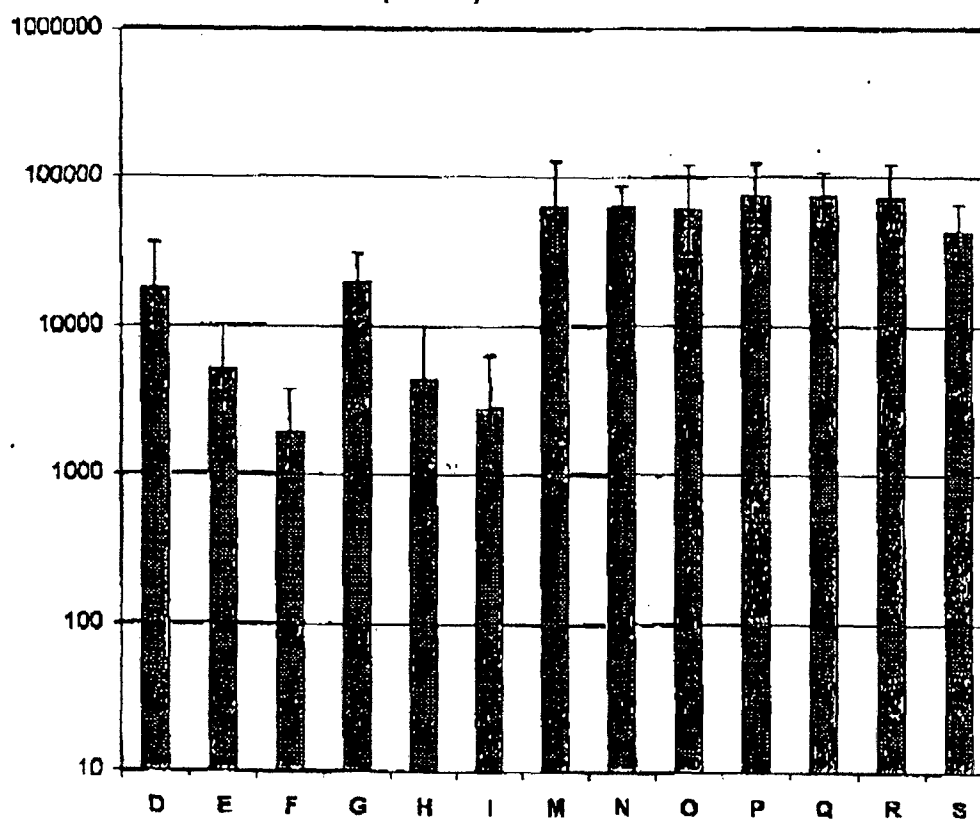
La invención se refiere a una formulación de vacuna que comprende un antígeno del virus respiratorio sincitial (RSV) y un oligonucleótido CpG inmunoestimulante, a procedimientos de preparación de la formulación de vacuna y a su uso en medicina. Pueden incluirse antígenos adicionales para proporcionar nuevas vacunas de combinación para su administración a niños, a adultos y a ancianos.

53

Figura 1

Anticuerpos Ig anti-FG

Valoraciones ELISA de GMT(UE/ml)



S
S4

Figura 2

Anticuerpos neutralizantes anti-RSV/A

Valoraciones de neutralización (GMT)

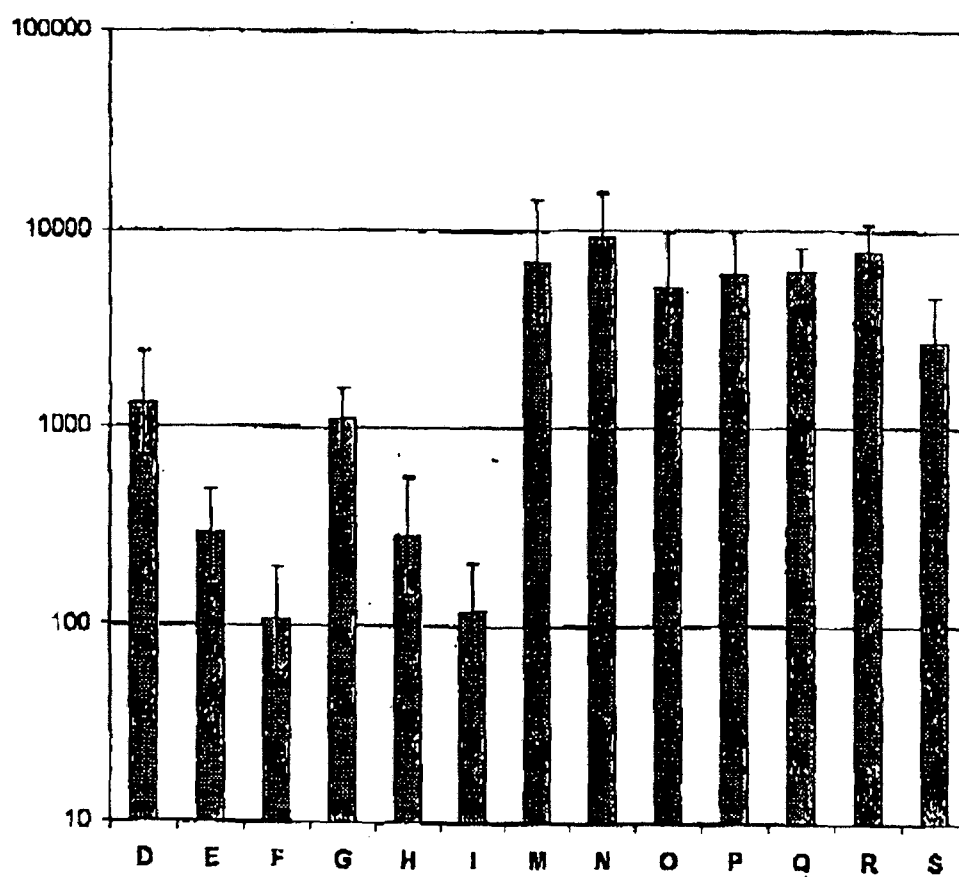
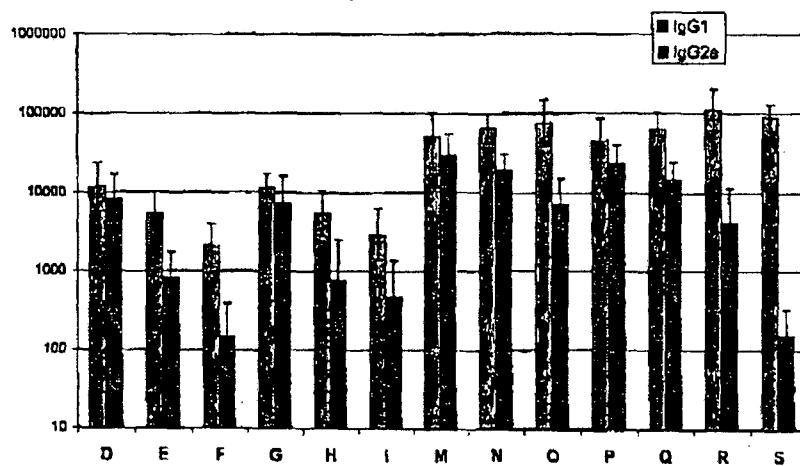


Figura 3

Respuesta isotipo anti-FG

A

Valoraciones ELISA de GMT (UE/ml)



Relación IgG1/IgG2a

B

Relación (media IgG1/media IgG2a)

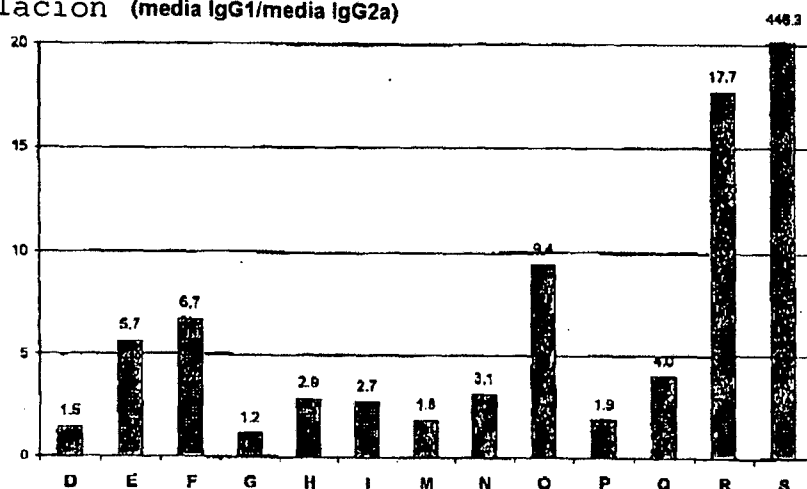


Figura 4

Día 14 después de II, IgG anti-PS

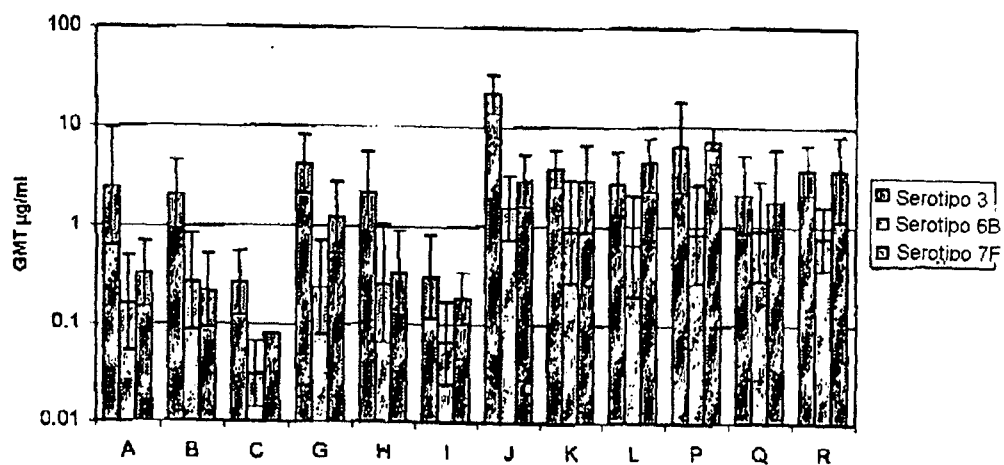


Figura 4 (cont)

Día 14 después de II, IgG anti-PS

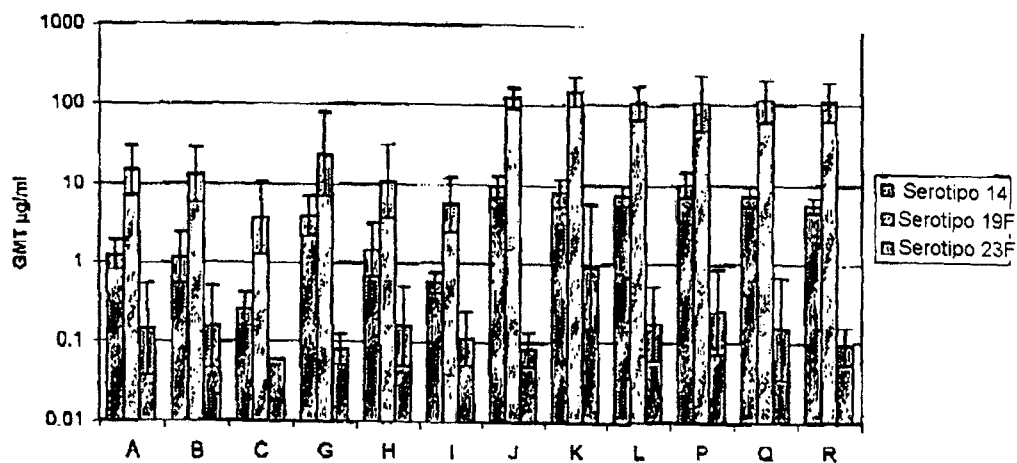
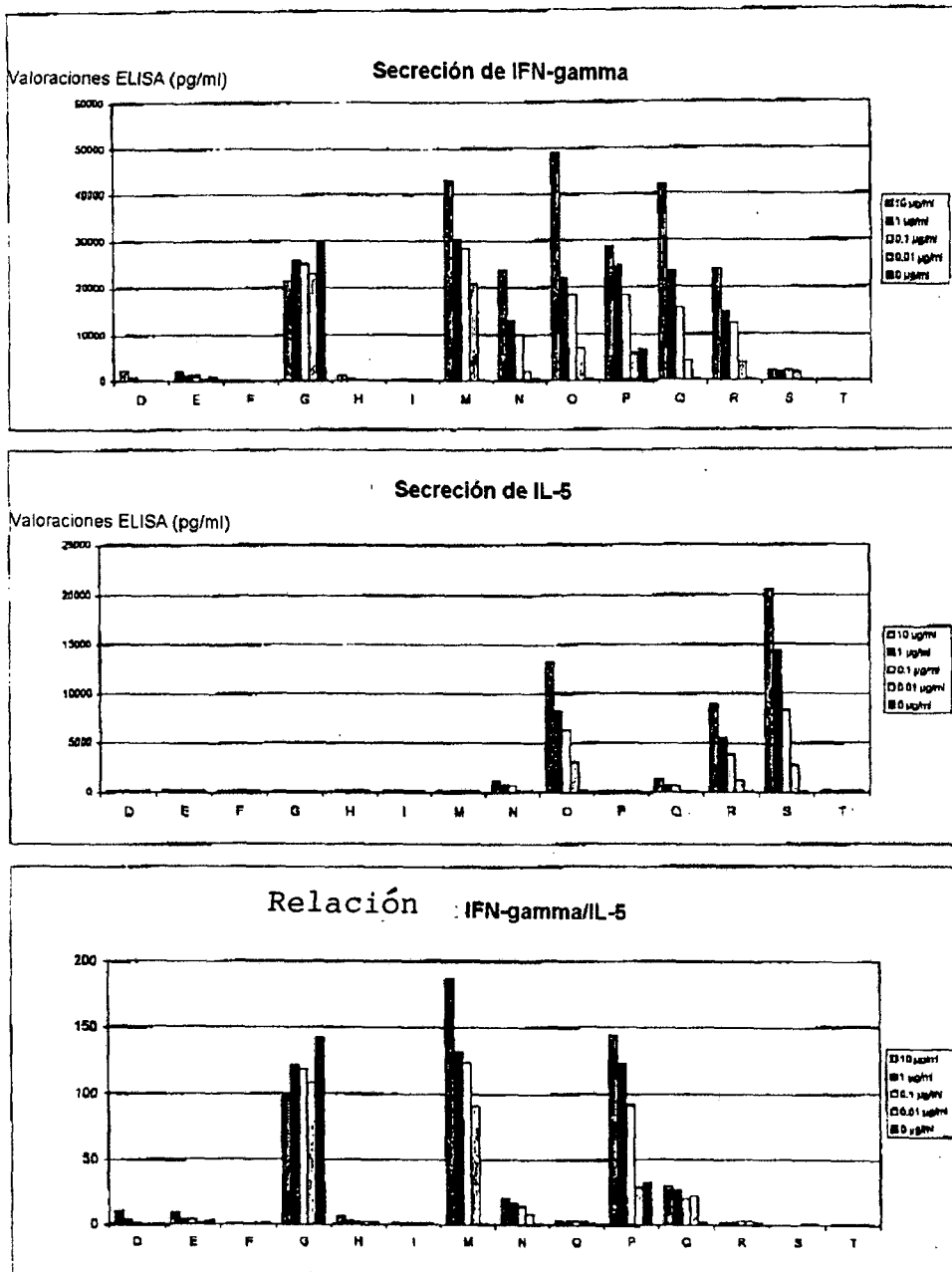


Figura 5

Combinación RSV/Strepneu: secreción de citocinas en
células de bazo



EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

SIC SUPERINTENDENCIA
DE INDUSTRIA
Y COMERCIO

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

58

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN:

(71) SOLICITANTE:

(30) PRIORIDAD:

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS s.a.

(31) No. DE SOLICITUD: 9909077.1
9915106.0

(72) INVENTORES:

(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN: Abril 20, 1999
Junio 28, 1999

Marguerite Deschamps

(33) PAÍS: Gran Bretaña

(74) APODERADO:

GERMAN CASTILLO GRAU

(54) TÍTULO: VACUNA

(57) RESUMEN:

- 1.- Una formulación de vacuna que comprende un antígeno RSV y un oligonucleótido CpG inmuonestimulante.

REQUISITOS MINIMOS P.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00028931 00000000 Folios: 59
Fecha (AMD): 2020-04-19 14:03:29
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- Nombre e identificación del Solicitante []
- Nombre e identificación del Inventor []
- Título o nombre de la Invención []
- Descripción []
- Reivindicaciones 47 []
- Resumen 51 []
- Comprobante de Pago 3 []

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 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

60

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 00-028931.

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

61
2000-04-25
430

EXPEDIENTE 00-028931

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 París.
- 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

67
2000-06-06
430

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Primer EXAMEN DE FORMA

Radicación no 00028931

Concepto Técnico no 814 Clasificación Internacional de Patentes A61K 39/155, A61K 39/39

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., 6 de junio /2000.

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

63 16

CONCEPTO TÉCNICO: 814
EXPEDIENTE: 00028931
IPC: A61K 39/155, A61K 39/39

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

1. El título de la invención es muy general, pues "VACUNAS" no permite establecer sobre que tipo de compuestos exactamente 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: "Vacunas que Comprenden un Antígeno del Virus Respiratorio Sincitial".
2. Las figuras contenidas en los folios 54 a 56 no son lo suficientemente nítidas para observar y distinguir los datos que en ella se reportan, y no permiten una buena copia a través de Offset o Scanner. Por consiguiente, requiere que se presenten una nueva copia más nítida y donde sea posible diferenciar los datos de las diferentes variables.
3. En consecuencia a lo anterior, sírvase presentar nueva tarjeta temática, nueva tarjeta para el archivo de propietarios y nuevo extracto de publicación.

Santa Fe de Bogotá,

/202016

EXPEDIENTE 00-028931

AUTO 1162

64
65
2000-06-15
430

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.

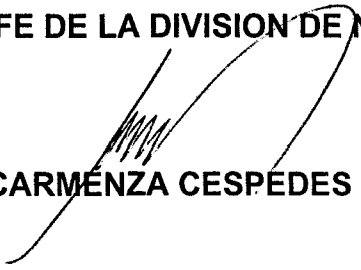
ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndolo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los _____

13 JUN 2000

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 5 JUN 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.



VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI _____ NO _____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA