

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
2000-3

1

SOLICITUD DE:

X

Patente de Invención

Patente de Modelo de Utilidad

2

S LICITANTE
(71)

Nombre: SMITHKLINE BEECHAM
BIOLOGICALS S.A.

Dirección: Rue de l'Institut

Lugar de Constitución: Bélgica

Domicilio: Rixensart, Bélgica

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número _____

3

REPRESENTANTE
APODERADO
(74)

Nombre: GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12

Teléfono: 285 7460 Fax: 28 9287

E-mail: info@castillograu.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

Número 17.017.671 TP 2.978

4

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: Michel Costa, Yves Lobet, Marcelle
Paulette Van-Mechelen, Christophe
Vernest.

Dirección Rue de l'Institut (todos)

Teléfono: Fax:

E-mail

Domicilio Rixensart, Bélgica (todos)

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

Número _____

5

Título (54)

^N
MUNOGENO COMPUESTO POR UN PEPTIDO Y UNA PROTEINA D DE
HAEMOPHILUS INFLUENZAE QUE ACTUA COMO PORTADORA

6

Clasificación Internacional (51)

A 61K 39/00 ; C 07K 16/00.

7

Prioridad

SI ☐ NO ☒

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

8

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses ☐

12 meses ☐

18 meses ☒

Otro ☐

9

Comprobante de pago N°:

02 66 988-

Fecha:

02-7/02-

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

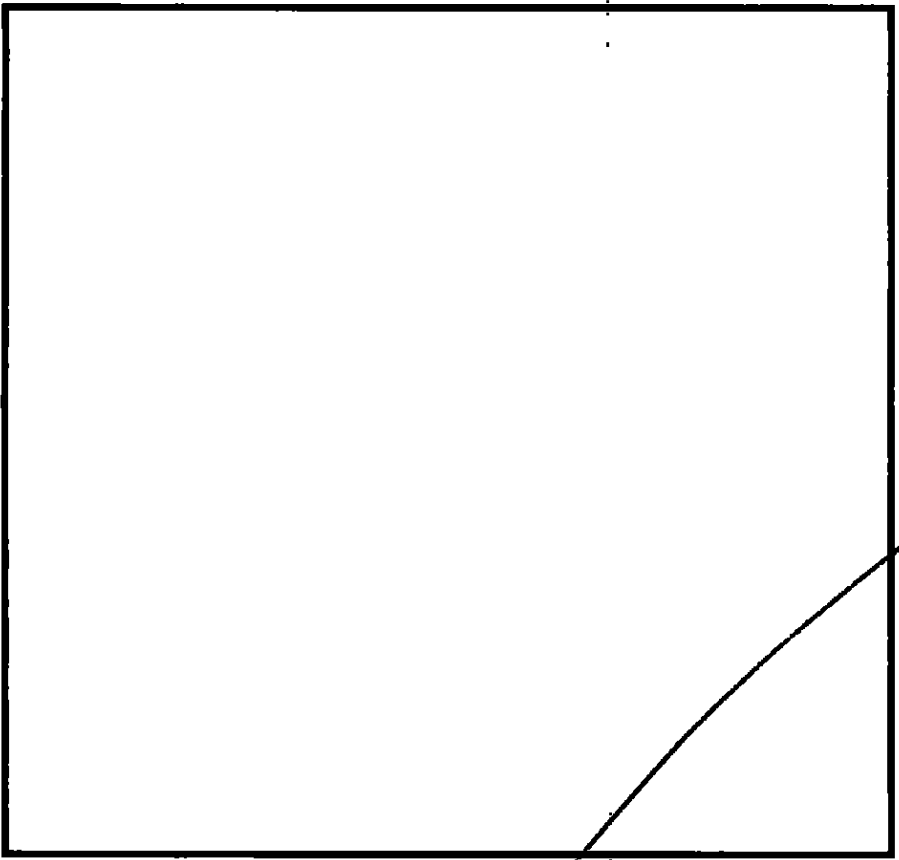
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso No. 16.769
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☐ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAU

FIRMA: [Handwritten Signature]

C.C. 17.017.671 de Bogotá F.P No. 2978 del C.S.J.



3.

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 02930004 00000000

Folios: 20

NIT : 800176089-2

Fecha (MM): 2002-10-07 14:14:14

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRADO/ 411 PRESENTIN

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO FISCIAL DE CAJA : 02 - 66,988
FECHA : OCTUBRE 7 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	3740488	07/10/2002	369,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
0005-01-01	SOLICITUDES	
	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
	TOTAL :	\$ 378,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

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

3

La presente invención se refiere a inmunógenos que comprenden un péptido y una portadora, en particular cuando la portadora es derivada de la Proteína D de *Haemophilus Influenzae*. Los inmunógenos de la presente invención pueden ser utilizados en composiciones farmacéuticas para la profilaxis o terapia de enfermedades, especialmente en la forma de vacunas. La invención se refiere a demás a su producción, composiciones farmacéuticas que las contengan, y su uso en medicina.

Los inmunógenos que comprenden péptidos cortos se vuelven cada vez más comunes en el campo de profilaxis de vacuna o terapia. Los péptidos utilizados comúnmente pueden ser el inmonógeno nativo de longitud total, por ejemplo hormonas peptídicas humanas, o fragmentos de un antígeno más grande derivado de un patógeno determinado, o de una auto proteína grande.

Frecuentemente, es posible y aconsejable en muchos estados de enfermedad diseñar vacunas que comprendan un péptido corto en lugar de una proteína grande. Por ejemplo, la inmunopprofilaxis de alergia puede comprender de manera benéfica el uso de péptidos cortos de IgE (EP 0 477 231 B1), mientras que el uso de IgE en si, como el inmunógeno, puede inducir *shock* anafiláctico. Además, una serie de autores han descrito el uso de la hormona liberadora Gonadotrofina de longitud completa (GnRH, WO 95/20600), un péptido largo de 10 aminoácidos cortos en el tratamiento de muchos cánceres o en inmunocastración.

La Solicitud de Patente Internacional No. WO 99/27944 – (Athena Neurosciences) revela que el fragmento de 39 a 43 aminoácidos de terminal N (A β) de la proteína del precursor amiloide puede tener utilidad en la prevención o en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Se dice que son útiles fragmentos más pequeños conjugados a una portadora. La aplicación se basa en la observación de que los ratones PDAPP que ya posean depósitos amiloides inyectados con el fragmento de 42 aminoácidos de terminal N de la proteína del precursor amiloide A β 42 en varias formulaciones adyuvantes retarda y previene la deposición amiloide progresiva y los cambios neuropatológicos consecuenciales en el cerebro del ratón PDAPP adulto. Adicionalmente, en PDAPP jóvenes inyectados con A β 42, que no se les había depositado o se les había depositado muy poco amiloide en sus cerebros y que no había consecuencias patológicas. De este modo, la información en la solicitud parece indicar que A β tiene un potencial tanto profiláctico como terapéutico.

Entre los problemas asociados con el enfoque péptido a la vacuna, se encuentra el hecho de que los péptidos de por si son inmunógenos deficientes. Generalmente, la

secuencia de los péptidos se escoge de modo que incluyan un epitopo de célula B para proporcionar un blanco para la generación de respuestas anticuerpo antipéptido, pero debido a su tamaño limitado, rara vez abarcan suficientes epitopos de célula N que proporcionen la necesaria ayuda de citoquina en la inducción de respuestas de célula B fuertes. Las estrategias diseñadas a superar esta falta de inmunogenicidad incluyen el enlace del péptido a portadoras de proteína altamente inmunogénicas que proporcionen ayuda de célula N circunstante, y/o el uso de adyuvantes fuertes en la formulación de la vacuna.

Ejemplos de estas portadoras altamente inmunogénicas que actualmente son utilizadas comúnmente para la producción de inmunógenos péptidos incluyen los toxoides de Difteria y Tétano (DT y TT, respectivamente), *Keyhole Limpet Haemocyanin* (KLH) y el derivado de proteína purificada de Tuberculina (PPD). Una serie de problemas se asocian con cada uno de estos portadoras utilizadas comúnmente, incluyendo tanto problemas en la producción de construcciones GMP como en las características inmunológicas de las construcciones. La presente invención proporciona una nueva portadora para uso en la preparación de construcciones de inmunógenos basadas en péptidos, que no sufran de las desventajas asociadas con este tipo de portadoras altamente inmunogénicas.

Entre las desventajas de estas portadoras está el hecho de que las respuestas inmunes específicas de antígenos pueden ser eliminadas por la presencia de anticuerpos preexistentes dirigidos contra la portadora. Por ejemplo, inmunes contra la toxina del Tétano (TT) (Di John y otros; Lancet, 16 de diciembre de 1989) suprimen la respuesta inmune a un péptido conjugado a TT. Este es un problema que puede hacerse evidente por el hecho de que en una población, al final, un porcentaje muy alto de personas tendrán inmunidad preexistente tanto a DT como a TT ya que son vacunadas de manera rutinaria con estos antígenos. En el Reino Unido, por ejemplo, 95% de los niños reciben la vacuna DTP que comprende tanto DT como TT. Otros autores han descrito el problema de eliminación de epitopos a vacunas de péptidos en modelos de animales (Sad y otros, *Immunology*, 1991; 74:23-27; Schutze y otros, *J. Immunol.* 135:4, 1985; 2319-2322)

Además, para vacunas que requieren refuerzos regulares, el uso de portadoras altamente inmunogénicas tales como TT y DT es probable que elimine la respuesta anticuerpo del péptido luego de varias inyecciones. Estas vacunas múltiples también pueden estar acompañadas de reacciones indeseables, tales como hiperrespuesta de tipo retardado (DTH).

KLH es conocido como un potente inmunógeno y ya ha sido utilizado como portadora para péptidos derivados de IgE (EP 0477231B1) en pruebas clínicas en humanos.

J

6.

Sin embargo, se han observado algunas reacciones adversas (reacciones tipo DTH o sensibilización a IgE) así como respuestas anticuerpos contra KLH que podrían competir con el anticuerpo antidecapéptido.

Por lo tanto, la selección de una proteína de portadora para una vacuna basada en péptido requerirá un equilibrio entre la necesidad de utilizar una portadora que funcione en todos los pacientes (amplio reconocimiento de MHC) y la inducción de altos niveles de respuestas anticuerpo antipéptido y de una baja respuesta de anticuerpos contra la portadora.

Los portadoras utilizadas previamente para vacunas basadas en péptidos, si bien pueden inducir altos niveles de respuestas anticuerpos de antipéptido en inmunización primaria, también pueden tener muchas desventajas.

La presente invención proporciona una proteína D de *Haemophilus Influenzae*, o fragmentos de la misma, como una portadora para vacunas basadas en péptidos, que induce altas respuestas inmunes antipéptido con una respuesta moderada o baja de antiportadora. Preferiblemente, el péptido es un péptido derivado de no *Haemophilus Influenzae*.

Uno de los campos de investigación donde se han hechos bastantes esfuerzos para diseñar vacunas basadas en péptidos es en la profilaxis y terapia de respuestas alérgicas. En respuesta a alérgenos, los síntomas de una respuesta alérgica son ocasionados por la liberación de mediadores (tales como histamina) de células inmunes dentro de los tejidos circundantes y estructuras vasculares. La histamina es almacenada normalmente en células mast o basófilas, hasta cuando la liberación sea activada por la interacción con IgE específica de alérgeno.

Es bien conocido el papel de la proteína IgE en la mediación de respuestas alérgicas, tales como asma, alergias contra alimentos, hipersensibilidad tipo I y sinusitis. Cuando se encuentran con un antígeno, tal como alérgenos de polen o acáridos, las células B comienzan la síntesis de la proteína IgE específica del alérgeno. La proteína IgE específica del alérgeno se enlaza luego a su receptor (el receptor de alta afinidad) en los basófilos y células mast. Cualquier encuentro con alérgeno hace que se active la liberación de histamina de las células mast o basófilos, y el enlace cruzado de IgE vecinas/complejo FcεRI (EP 0 477 231 B1).

Ya se ha investigado una serie de enfoques inmunoterapéuticos e inmonoprolácticos, pasivos o activos, que interfieren con este mecanismo de liberación de histamina mediada por IgE. Estos enfoques incluyen el uso de péptidos IgE específicos para inmunización activa, con el fin de estimular los anticuerpos auto anti-IgE capaces de

7

inhibir la liberación de histamina mediante la interferencia con la señal de activación mediada por IgE.

La Patente EP 0 477 231 B1 describe uno de estos enfoques. Los péptidos derivados del dominio Cε4 de IgE (residuos 497-506 conocidos también como el decapeptido Stanworth), se conjugaban con KLH. Se sugiere un número de portadoras para los péptidos IgE, incluidos KLH, toxoide del Tétano, toxoide de Difteria, albúminas haemocianinas tales como KLH, polímeros de aminoácidos, y preferiblemente, el derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD).

La Patente WO 95/26365 prosigue con la investigación del péptido Cε4 (497-506) y describe inmunógenos que se convierten sustancialmente libres de la proteína de portadora mediante la adición de epitopos universales auxiliares T. Los inmunógenos de la Patente WO 95/26365 se encuentran en la fórmula general:

$$(A)_n-(Th)_m-(B)_o-(Stan)_p$$

donde A es un aminoácido; Th es un epitopo auxiliar T; B es un aminoácido; y Stan es el decapeptido Stanworth, n=1 a 10; m=1 a 4; o=0 a 10; y p=1 a 3.

La Patente WO 98/24808 describe oligopéptidos derivados de Cε3 que interactúan con receptores de IgE de alta o baja afinidad. Estos oligopéptidos son expresados como proteínas de fusión junto con el socio de expresión Glation-S-transferasa (GST). La Patente WO 97/31948 describe inmunógenos del péptido IgE conjugados con una portadora de proteína; los portadoras descritos son TT, DT, KLH y PPD.

Otra área importante de investigación de vacuna de péptidos ha sido en el campo de vacunas de hormonas de péptidos humanos. Por ejemplo, la hormona de péptido, o la hormona liberadora de la hormona Gonadotrofina (GnRH) ha sido utilizada para la inmunoterapia de enfermedades dependientes de la Hormona Esteroide Gonadal, tales como muchos cánceres (incluido el cáncer de próstata) e immunoanticoncepción. La Patente WO 95/206000 describe el uso de GnRH conjugada a una proteína de portadora con el fin de hacerla inmunogénica. El ejemplo de una portadora utilizado en los ejemplos es toxoide Difteria (DT).

Otro trabajo en la técnica utiliza portadoras similares incluidas PPD, TT, DT Y el derivado de DT, CRM197, albúmina de suero bovino (BSA), Albúmina de Suero Equino (ESA), gamaglobulina Equina, Ovalbumina (OVA) *Keyhole Limpet Haemocianina* (KLH), tiroglobulina porcina, adhesinas bacteriales, hemaglutinina viral, antígeno de superficie de Hepatitis B toxina bacteriana tal como LTB, lipoproteína de membrana externa de *E. Coli*,

47

8

proteína TraT, polipéptido de leucotoxina, proteína exotoxina de *Pseudomonas* PE38QQR (EP 0 293 530 A2; EP 0 181 236 B1; WO 90/03182; EP 0 222 835; EP 0 446 313 B1; WO 96/24675; US 5,324,512; US 4,975,420; WO 97/15316, WO 97/15325; WO 97/15317; WO 90/02187).

En el contexto de la utilización de péptidos A β , la solicitud de patente Internacional No. WO 99/2794 contempla conjugar el péptido a una proteína de portadora convencional. Estas proteínas de portadora que cita esta solicitud tiene las desventajas arriba mencionadas.

La presente invención supera estos problemas asociados con las portadoras de péptidos de la técnica anterior. Sorprendentemente, los problemas son superados por el uso de la Proteína D como una portadora de péptido para la preparación de inmunógenos.

La proteína D es una proteína ligante con IgD de *Haemophilus influenzae* y ha sido patentada por Forsgren WO 91/18926 (EP 0 594 610 B1). La patente describe la clonación, expresión y secuencia de la proteína D. Sugiere que sus usos podrían ser métodos para detectar IgD utilizando su afinidad selectiva para IgD (al igual que para la Proteína A y la Proteína G) y en la estimulación del sistema inmune mediante la interacción con linfocitos B.

La Patente EP 0 594 610 B1 describe además el gen de la Proteína D, y sugiere que puede ser fusionado a otros genes y expresado para formar proteínas de fusión.

Akkoyunly y otros (*Infection and Immunity*, 1997, 65, 12, 5010-5016) y Akkoyunly y otros (*Infection and Immunity*, 1996, 64, 11 4586-4592) describe la purificación a grande escala de la forma no acilada de la Proteína D y su uso en vacunas. Los ratones y ratas inmunizados tenían altos niveles de proteína D específica de IgA e IgG.

La presente invención provee el uso de la proteína D como una portadora de inmunógenos de péptidos. Este tipo de inmunógenos tienen la ventaja de inducir altos niveles de respuestas inmunes antipéptido al tiempo que inducen una respuesta humoral moderada contra ellos mismos. En el contexto de una vacuna de alergia, la proteína D como portadora tiene la ventaja adicional de inducir bajas respuestas IgE antiportadora en comparación con portadoras conocidas, tales como KLH.

En algunas circunstancias, por ejemplo, en sistemas de expresión recombinante, puede ser aconsejable utilizar fragmento de proteína D, por ejemplo proteína D 1/3 (que comprende de 100 a 110 aminoácidos de terminal N de proteína D (GB 9717953.5)). Por

9.

consiguiente, la presente invención provee la proteína D o un fragmento de la misma, y un inmunógeno de péptido para uso en la fabricación de un inmunógeno.

Por lo tanto, los inmunógenos de la presente invención comprenden un péptido conjugado a una proteína D como una portadora. Preferiblemente, los péptidos son conjugados químicamente.

El término "péptido" dentro del significado de la presente invención, es un polímero de aminoácidos que contiene una secuencia de aminoácidos inferior a 100 aminoácidos en longitud, preferiblemente de 2 a 50 aminoácidos en longitud, y más preferiblemente entre 2 y 45 aminoácidos en longitud, y más preferiblemente de 2 a 30 y aún más preferiblemente entre 5 y 365 aminoácidos en longitud. Los péptidos de la presente invención pueden ser lipidados o no lipidados. Sin embargo, debe observarse que los residuos de péptidos pueden ser unidos en cualquier forma química conveniente, por ejemplo, mediante el enlace de ésteres y similar, pero típicamente, serán unidos por un enlace de péptidos.

Los péptidos pueden ser secuencias de longitud completa de péptidos que ocurren naturalmente, como hormonas de péptidos. Alternativamente, los péptidos pueden derivarse de autoproteínas o proteínas que ocurren naturalmente, derivadas de patógenos. En cierto contexto, será aconsejable utilizar aminoácidos no naturales tales como aminoácidos D.

En el contexto de un péptido A β , el péptido también incluye preferiblemente el péptido que ocurre naturalmente, de entre 39 y 43 aminoácidos en longitud. De este modo, las secuencias preferidas corresponden a formas que ocurren naturalmente, es decir, la secuencia correspondientes a aminoácidos 1 a 39, 1 a 40, 1 a 41, 1 a 42, 1 a 43 de la proteína del precursor amiloide que los publica Hardy y otros, TINS 20, 155 - 158, 1997.

Los fragmentos inmunogénicos de A β 43 también pueden ser acolados a la Proteína D de acuerdo con la invención. Fragmentos preferidos incluyen péptidos que incorporan residuos seleccionados del grupo; A β 1-5; 1-12, 13-28; 17-28 y 33-42. Este tipo de construcciones encuentran utilizadas en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer. También se contemplan los mimotopos de péptidos de A β 43 o fragmentos de los mismos.

Ejemplos especialmente preferidos de péptidos para uso como inmunógenos de la presente invención incluyen GnRH o mimotopos o análogos de los mismos: GnRH tiene la secuencia EHWSYGLRPG (SEQ ID NO. 1). Alternativamente, las repeticiones tandem de GnRH tal como E-H-W-S-Y-G-L-R-P-G-S-C-S-E-H-W-S-Y-G-L-R-P-G-NH₂ (SEQ ID NO. 2) pueden ser conjugadas a una molécula de proteína D, típicamente a través de una

9

cisteína central. La presente invención también contempla dímeros tandem tales como E-H-W-S-Y-G-L-R-P-G-Q-H-W-S-Y-G-L-R-P-G-S-C-E-H-W-S-Y-G-L-R-P-G-Q-H-W-S-Y-G-L-R-P-G-NH₂ (SEQ ID NO. 3). Ventajosamente, estos son conjugados con la Proteína D vía la Cisteína central. Este tipo de construcciones encuentran utilidad, entre otras, en el tratamiento de cánceres de Próstata. Alternativamente, GnRH puede ligarse a la Proteína D vía un espaciador de péptidos. Espaciadores típicos incluyen Cys(Pro)₄ Ser Ser.

En otra realización preferida, los péptidos son derivados de IgE mamífera, de manera que los inmunógenos puedan estimular una respuesta anticuerpos anti-IgE no anafiláctica en un individuo vacunado. Por ejemplo, los decapeptidos Stanworth descritos en la Patente EP 0 477 231 B1, por ejemplo, KTKGSGFFVF (SEQ ID NO. 4) o mimotopos de los mismos. Otros péptidos IgE se describen en las Patentes WO 97/31948 y WO 96/14333 y son útiles en los inmunógenos de la presente invención.

Epitopos preferidos de IgE son por ejemplo aquellos de superficie expuesta y tienen las siguientes secuencias:

<i>Péptido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Longitud expuesta</i>	<i>Dominio IgE</i>
P1	EDGQVMD (SEQ ID NO. 5)	9	C2
P2	STTQEGEL (SEQ. ID NO. 6)	8	C2
P3	SQKHWLSDRT (SEQ. ID NO. 7)	10	C2
P4	GHTFEDSTKKCADSNPRGC (SEQ ID. NO. 8)	19	C2/C3

P1 y P2 están localizados dentro del dominio C2 de IgE, dentro de una región que no ha sido previamente reportada como útil para la inmunopprofilaxis activa de alergia basada en vacuna.

Por lo tanto, la presente invención incluye los péptidos nativos en si y cualquier mimotopo de los mismos. El significado de mimotopo se define como una secuencia de péptidos que es suficientemente similar al péptido nativo (secuencial o estructuralmente), que puede ser reconocido por anticuerpos que reconocen el péptido nativo; o que pueden elevar anticuerpos cuando son acoplados a una portadora adecuada; dichos anticuerpos pueden reconocer el péptido nativo.

Los mimotopos de péptidos pueden ser diseñados para un propósito en particular mediante la adición, eliminación o sustitución de aminoácidos elegidos. De este modo, los péptidos pueden ser modificados para facilidad de la conjugación a una portadora de proteína. Por ejemplo, para algunos métodos de conjugación química, puede ser

aconsejable incluir una cisteína terminal. Además, para péptidos conjugados con una portadora de proteína, puede ser aconsejable incluir un distal de terminal hidrofóbica del terminal conjugado del péptido, de modo que el extremo libre n o conjugado del péptido permanezca asociado con la superficie de la proteína de la portadora, presentando de este modo el péptido en una conformación que se asemeje más íntimamente con la del péptido tal como se encuentra en el contexto de la molécula nativa completa.

Ejemplos de este tipo de péptidos modificados útiles como medicamento antialérgico incluyen:

<i>Péptido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Descripción</i>
P10	CADSNPRGV (SEQ ID. NO. 9)	Variante P4
P15	CLEDGQVMDVDLL-NH2 (SEQ ID NO.10)	Variante P1
P16	CSTTQEGELA-NH2 (SEQ ID NO.11)	Variante P2
P17	CSQKHWLDSRT-NH2 (SEQ ID NO.12)	Variante P3

Los inmunógenos de la presente invención pueden contener alternativamente un péptido capaz de provocar una respuesta inmune contra un patógeno humano. Estos péptidos pueden derivarse del siguiente grupo; un antígeno VIH (tal como tat, nef, gp 120 o gp 160), un antígeno del virus herpes humano (tal como gD o derivados del mismo o proteína Temprana Inmediata tal como ICP27 de HSV1 o HSV2), un antígeno de citomegalovirus (tal como gB o derivados del mismo), un antígeno Rotavirus, un antígeno del virus Epstein Barr (tal como gp350), antígenos del Virus *Varicella Zoster* (tales como gp1, II e IE63), o de un virus de hepatitis tal como virus de hepatitis B (por ejemplo, antígeno de Superficie de Hepatitis B), antígeno del virus de hepatitis A, virus de hepatitis C y virus de hepatitis E, o de otros patógenos virales tales como paramixovirus; antígenos de los virus Cincitial Respiratorio (tales como proteínas F y G), virus de parainfluenza, virus de sarampión, virus de paperas, virus de papiloma humano (por ejemplo HPV6, 11, 16, 18), flavivirus (por ej: virus de Fiebre Amarilla, virus de Dengue, virus de encefalitis transmitida por garrapata, virus de Encefalitis Japonesa) o virus de Influenza, o péptidos derivados de patógenos bacteriales tales como *Neisseria spp*, incluidos *N. Gonorrhea* y *N. Meningitidis* (para proteínas ligantes de transferina, lactoferina, PilC, adhesinas); *Streptococcus spp*, incluida *S. Pneumoniae* (proteínas ligantes de estreptolisina o colina), *S. Pyrogenes* (por ejemplo proteínas M, proteasa C5A), *S. Agalactiae*, *S. Mutans*; *Haemophilus spp*, incluidos *H. Influenzae* tipo B, *H. Influenzae H* no tipificables (por ejemplo, OMP26, adhesinas de peso molecular alto, P5, P6), *H. Ducreyi*, *Moraxella spp*, incluida *M catarrhalis*, conocida también como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de peso molecular alto y bajo); *Bordetella spp*, incluida *B. Pertussis* (por ejemplo pertactina, toxina de pertussis, hemaglutinina filamentosa, cilasa adenilata,



fimbriae), *B. paraptussis* y *B. Bronchiseptica*; *mycobacterium spp*, incluida *M. Tuberculosis* (por ejemplo ESAT6, Antígeno 85A, -B o -C), *M. Bovi*, *M. Leprae*, *M. Avium*, *M. Paratuberculosis*, *M. Smegmatis*; *legionella spp*, incluida *L. pneumophila*; *Escherichia spp*, incluida *E. coli* enterotóxico (por ejemplo factores de colonización, toxina lábil al calor o derivados de la misma, toxina estable al calor o derivados de la misma), *E. Coli* enterohemorrágico, *E. Coli* enteropatógeno (por ejemplo toxina similar a toxina shiga o derivados de la misma); *Vibrio spp*, incluido *V. Cholera* (por ejemplo, toxina del cólera o derivados de la misma), *Shigella spp*, incluida *S. Sonnei*, *S. Dysenteriae*, *S. Flexnerii*; *Yersinia spp*, incluida *Y. enterocolitica* (por ejemplo una proteína Yop), *Y. Pestis*, *Y. Pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp*, incluida *C. Jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. Coli*; *Salmonella spp*, incluida *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis*; *Listeria spp*, incluida *L. Monocytogenes*; *Helicobacter spp*, incluida *H. Pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina vacuolante); *Pseudomonas spp*, incluida *P. Aeruginosa*; *Staphylococcus spp*; incluida *S. Aureus*, *S. Epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluidas *E. Faecalis*, *E. Faecium*; *Clostridium spp*, Incluida *C. Tetani* (por ejemplo toxina del tétano y derivado de la misma), *C. Botulinum* (por ejemplo toxina de botulinum y derivado de la misma), *C. Difficile* (por ejemplo toxinas de clostridium A o B y derivados de las mismas); *Bacillus spp*, incluida *B. Anthracis* (por ejemplo toxina de botulinum y derivados de la misma); *Corynebacterium spp*, incluida *C. Diphtheriae* (por ejemplo toxina de difteria y derivados de la misma); *Borrelia spp*, incluida *B. Burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. Afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. Andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp*, incluida *E. equi* y el agente de *Ehrlichiosis* Granulocítica Humana; *Rickettsia spp*, incluida *R. Rickettsii*; *Chlamydia spp*; incluida *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas ligantes de heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas ligantes de heparina), *C. Psittaci*; *Leptospira spp.* incluida *L. Interrogans*; *Treponema spp*, incluida *T. Pallidum* (por ejemplo las proteínas raras de membrana externa), *T. Denticola*, *T. Hyodysenteriae*; o derivadas de parásitos tales como *Plasmodium spp.*, incluidos *P. Falciparum*; *Toxoplasma spp*, incluida *T. Gondii* (por ejemplo SAG2, SAG3, TG34); *Entamoeba spp*; incluida *E. Histolytica*; *Babesia spp.*, incluida *B. Microti*; *Trypanosoma spp.*, incluida *T. Cruzi*; *Giardia spp*, incluida *G. Lamblia*; *Leshmania spp*, incluida *L. Major*; *Pneumocystis spp.*, incluida *P. carinii*; *Trichosomas spp* incluida *T. Vaginalis*; *Schistosoma spp*, incluida *S. Mansoni* o derivada de levadura tal como *Candida spp*. incluida *C. Albicans*; *Cryptococcus sp.* incluida *C. Neoformans*.

Las vacunas de la presente invención comprenden además péptidos derivados de parásitos causantes de Paludismo. Los péptidos pueden ser derivados de la proteína

circumsporozoita (CS) de *P. falciparum* o antígenos TRAP (WO 90/01496). Otros antígenos de plasmodia que pueden ser candidatos como donantes de péptidos para una vacuna multietapa contra el Paludismo son *P. falciparum* MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Squestrin, PfMEP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, Pfs27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en *Plasmodium spp.*

Los inmunógenos de la presente invención también pueden contener un péptido antitumoral y ser útiles para el tratamiento inmunogénico de cánceres. Por ejemplo, la formulación adyuvante encuentra utilidad con antígenos de rechazo tumoral como aquellos para cáncer de la próstata, seno, colorrectal, pulmonar, pancreático, renal o melanomas. Algunos ejemplos de antígenos incluyen MAGE1 y MAGE3 u otros antígenos MAGE para el tratamiento de melanoma o tumor que exprese MAGE (en particular, el péptido EVDPIGHLY (SEQ ID NO. 13) (Pat. Estadounidense 5,662,907), PRAME, BAGE o GAG (Robbins y Kawakami, 1996, *Current Opinions in Immunology* 8, págs 628-636; Van den Eynde y otros, *International Journal of Clinical & Laboratory Research* (entregado en 1997); Correale y otros (1997), *Journal of the National Cancer Institute*, 89, pag. 293. Sin duda, estos antígenos son expresados en una amplia gama de tipos de tumor tales como melanoma, carcinoma pulmonar, sarcoma y carcinoma de la vejiga. Otros péptidos derivados de antígenos específicos de tumores son indicados para ser utilizados con el adyuvante de la presente invención e incluyen, más no están limitados a antígeno específico de la Próstata (PSA) o Her-2/neu, KSA (GA377), MUC-1 y antígeno carcioembrionario (CEA). Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención se provee un inmunógeno que comprende un péptido derivado de antígeno de rechazo tumoral acopado a la proteína D.

Los péptidos utilizados en la presente invención pueden ser sintetizados rápidamente mediante procedimientos de fase sólida conocidos en la técnica. Se pueden hacer síntesis adecuadas utilizando procedimientos "T-boc" o "F-moc". Los péptidos cíclicos pueden ser sintetizados mediante procedimiento de fase sólida empleando el conocido procedimiento "F-moc" y la resina poliamida en el aparato totalmente automatizado. Alternativamente, la persona versada en la técnica conocerá los procedimientos de laboratorio necesarios para realizar el proceso manualmente. Las técnicas y los procedimientos para la síntesis de fase sólida se describen en la publicación: "*Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*" por E. Atherton y R.C. Sheppard, publicada por IRL en Oxford University Press (1989). Alternativamente, los péptidos pueden ser producidos mediante métodos recombinantes, incluyendo la expresión de moléculas de ácido nucleico que codifiquen los mimotopos en una línea celular bacteriana

o mamífera, seguida por la purificación del mimotopo expresado. Las técnicas para expresión recombinante de péptidos y proteínas son conocidos en la técnica y se describen en Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook y otros en *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2da edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, New York (1989).

La relación de péptido a portadora de proteína D es típicamente en el orden de entre 1:1 a 1:20, pero preferiblemente entre 2 a 10 péptidos por portadora de Proteína D, típicamente 3 a 8. Diferentes péptidos pueden ser acoplados a la misma molécula de portadora para proporcionar un inmunógeno híbrido.

El acoplamiento covalente del péptido a Proteína D o fragmento de la misma puede hacerse de una manera conocida en la técnica. Así, por ejemplo, para acoplamiento covalente directo es posible utilizar un carbodiimida, glutaraldehído o (N-[í, por ejemplo, para acoplamiento covalente directo es posible utilizar un carbodiimida, glutaraldehído o (N-[γ-maleimidobutiriloxi] succinimida éster, utilizando ligantes heterobifuncionales comunes comercialmente disponibles, tales como CDAP y SPDP (haciendo uso de las instrucciones del fabricante). Luego de la reacción de acoplamiento, el inmunógeno puede ser aislado fácilmente y purificado a través de un método de diálisis, un método de filtración de gel, un método de fraccionamiento, etc.

En una realización preferida, las vacunas de la presente invención son utilizadas preferiblemente para la profilaxis o terapia de alergia. Este tipo de vacunas pueden comprender péptido específico de alérgeno (por ejemplo de Der p1) o péptidos no específicos de alérgeno (por ejemplo, el decapeptido Stanworth o P1 a P4 o un mimotopo del mismo).

Las vacunas de la presente invención comprenden un inmunógeno tal como se describe arriba y un adyuvante. En la técnica se conocen adyuvantes adecuados (*Vaccine Design – The Subunit and Adjuvant Approach*, 1995, *Pharmaceutical Biotechnology*, Vol. 6, Eds. Powell, M.F. y Newman, M.J. Plenum Press, New York N.Y., ISBN 0-306-44867-X).

Adyuvantes preferidos para uso con inmunógenos de la presente invención incluyen: sales de aluminio o calcio (ej: hidróxido o fosfato), emulsiones aceite en agua (WO 95/17210, EP 0 399 843), o portadoras de partículas tales como liposomas (WO 96/33739). Particularmente se prefieren fracciones de saponina inmunológicamente activas (por ej: Quil A) que tengan actividad adyuvante derivadas de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja Saponaria Molina*. Los derivados de Quil A, por ej; QS21 (un derivado de fracción purificada de HPLC de Quil A), y el método de su producción se

revelan en la Patente estadounidense No, 5,057.540. Entre QS21 (conocida como QA21), también se revelan otras fracciones tales como QA17. El lípido A monofosforil 3-De-O-acilado es un adyuvante conocido fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Puede prepararse por los métodos enseñados en GB 2122204B. Una forma preferida de lípido A monofosforil 3-De-O-acilado es en la forma de una emulsión que tiene un tamaño de partícula pequeño inferior a 0.2µm en diámetro (EP 0 689 454 B1).

Los adyuvantes también incluyen, más no están limitados al dipéptido de muramil y saponinas tal como Quil A, lipopolisacáridos bacteriales tales como lípido A monofosforil 3D-MPL (3-O-deacilado) o TDM. Como ejemplo de otra alternativa, la proteína puede ser encapsulada dentro de micropartículas tales como liposomas, o en suspensiones no particuladas de polioxietilen éter (Solicitud de Patente del Reino Unido No. 9807805.8). Los adyuvantes especialmente preferidos son combinaciones de 3D-MPL y QS21 (WO 95/17210, PCT/EP98/05714), 3D-MPL formulado con otras portadoras (EP 0 689 454 B1), o QS21 formulado en colesterol que contenga liposomas (WO 96/33739), u oligonucleótidos inmunoestimuladores (WO 96/02555).

Ejemplos de excipientes farmacéuticamente adecuados incluyen agua, salina tamponada de fosfato, soluciones tamponadores isotónicas. Las vacunas de la presente invención también pueden ser administradas por vía oral. En estos casos, el excipiente farmacéuticamente aceptable también puede incluir tamponadores alcalinos o cápsulas digeribles.

Las formulaciones de la presente invención pueden ser utilizadas tanto para fines profilácticos como terapéuticos. Por lo tanto, la presente invención provee un método de tratamiento a un mamífero susceptible o que sufra de una enfermedad infecciosa o trastornos crónicos, tales como cáncer, alergia o enfermedad autoinmune. En particular, las composiciones (dependiendo del péptido que se utilice) de la presente invención son útiles en el tratamiento y prevención de Alzheimer, Alergia y Cáncer de la Próstata. En otro aspecto de la presente invención se4 proporciona una vacuna tal como se describe en este contexto para uso en medicina. La preparación de la vacuna se describe en términos generales en *New Trends and Developments in Vaccines*, publicada por Voller y otros, University Park Press, Baltimore, Maryland, EE.UU. 1978.

En otro aspecto de la presente invención, se provee un inmunógeno o vacuna para uso en medicina.

La preparación de vacuna de la presente invención puede ser utilizada para proteger o tratar un mamífero susceptible o que sufra de alergias, mediante la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosa. Este tipo de administraciones puede incluir

inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradermal o subcutánea; o por administración mucosa a las vías oral/alimentaria, respiratoria, o genitourinaria.

La cantidad de proteína en cada dosis de vacuna es seleccionada como una cantidad que induzca una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos o significativos en los vacunados. Esta cantidad puede variar dependiendo del inmunógeno específico que se emplee y la forma en que se presente. Generalmente, se espera que cada dosis comprenda entre 1-100µg de proteína, preferiblemente de 1-500µg, preferiblemente entre 1-100µg, de los cuales, 1 a 50µg es el rango más preferido. Una cantidad óptima para una vacuna en particular puede determinarse por estudios estándar que impliquen la observación de respuestas inmunes adecuadas en los sujetos. Luego de una vacuna inicial, los sujetos pueden recibir uno o más refuerzos espaciados debidamente.

La preparación de la vacuna se describe generalmente en *New Trends and Developments in Vaccines*, publicada por Voller y otros, University Park Press, Baltimore, Maryland, EE.UU. 1978. La conjugación de proteínas a macromoléculas la revela Likhite, Patente EE.UU. 4,372,945 y por Armor y otros, Patente EE.UU. 4,474.757.

17

REIVINDICACIONES:

1. Un inmunógeno que comprende un péptido y Proteína D de *Haemophilus Influenzae*, o un fragmento del mismo como portadora.
2. Un inmunógeno según la reivindicación 1, en donde el péptido es entre 2 y 50 residuos de aminoácidos en longitud.
3. Un inmunógeno según la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho péptido es derivado de uno de un epitopo o mimotopo IgE, hormona liberadora de la hormona de Gonadotrofina o mimotopo de la misma, un fragmento de la proteína del precursor amiloide o mimotopo de la misma.
4. Un inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la relación de péptido:portadora de proteína D es 1:20.
5. Un inmunógeno según la reivindicación 4 en donde la relación péptido; portadora proteína D es 2:10 péptidos por portadora de proteína D.
6. Un inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el péptido es A β 43 de la proteína del precursor amiloide o un fragmento de la misma.
7. Un inmunógeno según la reivindicación 6, en donde los fragmentos son péptidos seleccionados del grupo de péptidos que incorporan residuos A β 1-5, 1-12, 13-28, 17-28 y 33-42.
8. Un inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende la secuencia EHWSYGLRPG como una repetición tandem conjugada a la proteína D a través de una cisteína central.
9. Un inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 derivado de un epitopo IgE seleccionado del grupo de péptidos que tienen las siguientes secuencias:

KTKGSGFFVF
EDGQVMDVD
STTQEGEL
SQKHWLSDRT
GHTFEDSTKKCADSNPRGV
10. Un inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los mimotopos son seleccionados del grupo que tiene las siguientes secuencias:

17

18

CADSNPRGV

CLEDGQVMDVDLL-NH2

CSTTQEGELA-NH2

CSQKHWLSDRT-NH2

11. Un inmunógeno según se reivindica aquí, en donde la portadora de proteína D es conjugada con una pluralidad de péptidos separados.
12. Una vacuna que comprende un inmunógeno según se reivindica aquí y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Una vacuna según la reivindicación 12 que comprende adicionalmente un adyuvante.
14. Una vacuna según la reivindicación 13, en donde el adyuvante es seleccionado de adyuvantes de Saponina, lípido A o un derivado del mismo, sal alumínica, emulsiones aceite en agua, liposomas o combinaciones de lo mismo.
15. Una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 para uso en medicina.
16. Un inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso en medicina.
17. Uso de un inmunógeno según se reivindica aquí, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad infecciosa o crónica.
18. Un método para fabricar un inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende el paso de conjugar un péptido a la proteína D o un fragmento de la misma.
19. Un método para fabricar una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que consiste en formular un inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
20. Un método para tratar a un paciente que sufra o que sea susceptible de una enfermedad crónica o infecciosa, que consiste en administrar una cantidad segura y efectiva de una vacuna o inmunógeno según se reivindica aquí.

18

VACUNA

La presente invención proporciona inmunógenos de péptidos ligados a una portadora, en donde la portadora es derivada de *Haemophilus Influenzae* Proteína D, o fragmento de lo mismo.

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA ()

INCOMPLETA () ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA ()

INCOMPLETA () ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA ()

INCOMPLETA () ()

Firma Responsable

Fecha

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



21/24

Industria y Comercio

INFORME DE PROTOCOLO PERINTENDENCIA

Expediente 02-90004

Fecha: 23 de octubre del 2002

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 202027.

Folio 26

2020
Bogotá, D. C.

Doctor(a)
GERMAN CASTILLO
Apoderado(a)

Oficio No. 15951

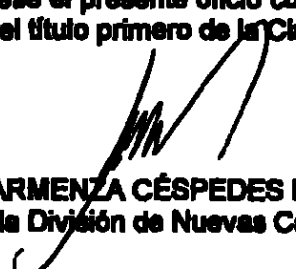
REFERENCIA:	Radicación	02-90004
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Allegar copia del documento en que conste la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante. (art. 26-k, Dec 486/2000).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 07 NOV. 2002

202027

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