



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

03-21874

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO VACUNA.

NUEVO TÍTULO: Vacuna de proteínas de S. pneumoniae

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A 61K 39/09

71. SOLICITANTE SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.

DOMICILIO Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica.

74. APODERADO CARLOS R. OLARIE.

22. BOGOTÁ, D. C. MARZO 14, 2003

PETITORIO

1/77

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

03 021874 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 03021874 00000000

Folios: 73 le radicación

Fecha (h.m.): 2003-03-14 16:52:46

Trámite: 1 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: ES29 DIVISION DE NUEVAS CREATIVIDADESFORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1	SOLICITUD DE :		
☒	Patente de Invención	☐	Patente de Modelo de Utilidad
☐	Capítulo I.	☒	Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. Dirección: Rue de l'Institute 89, B-1330 Rixensart, Belgica Nacionalidad o Domicilio: Belga Lugar de Constitución: Belgica Teléfono: Fax: E-Mail:	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
--------------------------	--	---

3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: CARLOS R. OLARTE Dirección: Avda 82 No. 10-62 Piso 6 Teléfono: 634-1500 Fax: 376-2211 E-Mail: patents.bogota@bakernet.com	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 79.782.747 Bú TP 74.295
-----------------------------------	--	--

4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: PHILIPPE HERMAND, CRAIG A J LAFERRIERE, YVES LOBET, JAN POOLMAN Dirección: Rue de l'Institute 89, B-1330 Rixensart, Belgica Nacionalidad o Domicilio: BELGA, CANADIENSE, BELGA, HOLANDESA
----------------------------	---

5 PCT (85)	Solicitud Internacional No. PCT/EP01/10570 Publicación Internacional No. WO 02/22168	Fecha Septiembre 12, 2001 Fecha Marzo 21, 2002
------------	---	---

6 Título (54)	VACUNA
NUEVO TÍTULO: Vacuna de proteínas de S. pneumoniae	

7 Clasificación Internacional (51)	A 61 K 39/09.
------------------------------------	---------------

8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen GB	(32) Fecha Septiembre 15, 2000	(31) Número de Solicitud 0022742.1
---	---------------------------	-----------------------------------	---------------------------------------

9 Comprobante de pago No.	58,406; 58,405; 8,106; 8,362	Fecha 17-09-01; 07-02-03
---------------------------	------------------------------	--------------------------

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

10

ANEXOS

2

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros:

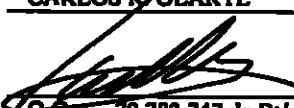
11

FIGURA CARATERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.E. 19.782.747 de Bta T.P. 74295

24.
3



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Comercio
IDENCIA

Radicación : 03021874 00000000 Folios: 73
Fecha (IMP): 2003-03-14 16:52:46
Tracate : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 58,406
FECHA : SEPTIEMBRE 17 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
JORGE LUIS GOMEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	6326376	17/09/2001	32,194,800.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-04	PRESENTACION DE OBSERVACIONES	
12		MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	190,080.00
		TOTAL :	\$ 190,080.00

SON: CIENTO NOVENTA MIL OCHENTA 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

4
SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 03021874 00000000

Folios: 73

mercio
I E N C I A

Fecha (A/D): 2003-03-14 16:52:46

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE MARCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 8020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 58,405
FECHA : SEPTIEMBRE 17 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
JORGE LUIS GOMEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	6526576	17/09/2001	32,194,800.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-04	PRESENTACION DE OBSERVACIONES	
		12 MARCAS Y LENAS COMERCIALES	190,080.00
		TOTAL :	\$ 190,080.00

SOM: CIENTO NOVENTA MIL OCHENTA 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

MIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 03 - 8,106
FECHA : FEBRERO 7 DE 2003

Radicacion : 03021874 00000000 Folios: 73
Fecha (MIB): 2003-03-14 16:52:46
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE MARC 411 PRESENTAC
Dependencia: 8020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CORREA ORDONEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	9010333	07/02/2003	40,214,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	3,000.00
		TOTAL :	3,000.00

SON: TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

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

6

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 0,362
FECHA : FEBRERO 7 DE 2003

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03021074 00000000 Folios: 73
Fecha (A/D): 2003-03-14 16:52:46
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2320 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CORREA ORDOÑEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	9010333	07/02/2003	40,214,000.00

CONCEPTO

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA ABO ANTR
		TOTAL : 0
		17,000.00

SON: DIEZ Y SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/22168 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K 39/09**, A61P 31/04
- (21) International Application Number: **PCT/EP01/10570** ✓
- (22) International Filing Date:
12 September 2001 (12.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0022742.1 15 September 2000 (15.09.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US):
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS SA [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **HERMAND, Philippe** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **LAFFERRIERE, Craig, Antony, Joseph** [CA/BE]; SmithKline Beecham Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **LOBET, Yves** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Beecham Biologicals, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **POOLMAN, Jan** [NL/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (74) Agent: **LUBIENSKI, Michael, John**; GlaxoSmithKline Beecham, Corporate Intellectual Property (CN9.25.1), 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, **CO**, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: **VACCINE**

(57) Abstract: The present invention relates to a combination of 2 or more *S. pneumoniae* proteins, their manufacture and use in medicine as a vaccine. Such combinations are particularly useful for the protection of infants and elderly against streptococcal infection.

WO 02/22168 A2

VACCINE

FIELD OF INVENTION

The present invention relates to a combination of 2 or more *S. pneumoniae* proteins, their manufacture and use in medicine as a vaccine. Such combinations are particularly useful for the protection of infants and elderly against streptococcal infection.

BACKGROUND OF INVENTION

Streptococcus pneumoniae is a Gram-positive bacterium responsible for considerable morbidity and mortality (particularly in the young and aged), causing invasive diseases such as pneumonia, bacteremia and meningitis, and diseases associated with colonisation, such as acute Otitis media. The rate of pneumococcal pneumonia in the US for persons over 60 years of age is estimated to be 3 to 8 per 100,000. In 20% of cases this leads to bacteremia, and other manifestations such as meningitis, with a mortality rate close to 30% even with antibiotic treatment.

Pneumococcus is encapsulated with a chemically linked polysaccharide which confers serotype specificity. There are 90 known serotypes of pneumococci, and the capsule is the principle virulence determinant for pneumococci, as the capsule not only protects the inner surface of the bacteria from complement, but is itself poorly immunogenic. Polysaccharides are T-independent antigens, and can not be processed or presented on MHC molecules to interact with T-cells. They can however, stimulate the immune system through an alternate mechanism which involves cross-linking of surface receptors on B cells.

It was shown in several experiments that protection against invasive pneumococci disease is correlated most strongly with antibody specific for the capsule, and the protection is serotype specific.

Streptococcus pneumoniae is the most common cause of invasive bacterial disease and Otitis media in infants and young children. Likewise, the elderly mount poor responses to pneumococcal vaccines [Roghmann *et al.*, (1987), J. Gerontol. 42:265-270], hence the increased incidence of bacterial pneumonia in this population [Verghese and Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].

A 23-valent unconjugated pneumococcal vaccine has shown a wide variation in clinical efficacy, from 0% to 81% (Fedson *et al.* (1994) Arch Intern Med. 154: 2531-2535). The efficacy appears to be related to the risk group that is being immunised, such as the elderly, Hodgkin's disease, splenectomy, sickle cell disease
5 and agammaglobulinemics (Fine *et al.* (1994) Arch Intern Med. 154:2666-2677), and also to the disease manifestation. The 23-valent vaccine does not demonstrate protection against pneumococcal pneumonia (in certain high risk groups such as the elderly) and Otitis media diseases.

Strategies, which have been designed to overcome this lack of
10 immunogenicity in infants, include the linking of the polysaccharide to large immunogenic proteins, which provide bystander T-cell help and which induce immunological memory against the polysaccharide antigen to which it is conjugated.

However, there is still a need for improved pneumococcal vaccine compositions, particularly ones which will be more effective in the prevention or
15 amelioration of pneumococcal disease (particularly pneumonia) in the elderly and in young children.

The present invention provides such an improved vaccine.

SUMMARY OF THE INVENTION

20

In one aspect, the present invention is an immunogenic composition comprising at least 2 *S. pneumoniae* proteins selected from the group consisting of Poly Histidine Triad family (PhdX), Choline Binding Protein family (CbpX), CbpX truncates, LytX family, LytX truncates, CbpX truncate-LytX truncate chimeric
25 proteins, pneumolysin (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 and Sp133. In a preferred embodiment, one of the proteins is from the Poly Histidine Triad family (PhdX). In another preferred embodiment, one of the proteins is from the Choline Binding Protein family (CbpX), or CbpX truncates, or CbpX truncate-LytX truncate chimeric proteins.

30

In a related aspect, the present invention provides a vaccine for treating or ameliorating Otitis media in infants or pneumonia in the elderly. Optionally the

the polyhistidine triad family (PhtX)), choline binding proteins (CbpX), proteins having a Type I Signal sequence motif (e.g., Sp101), proteins having a LPXTG motif (where X is any amino acid, e.g., Sp128, Sp130), toxins (e.g., Ply), etc. Preferred examples within these categories (or motifs) are the following proteins, or
5 immunologically functional equivalents thereof.

The immunogenic composition of the invention comprises at least 2 proteins selected from the group consisting of the Poly Histidine Triad family (PhtX), Choline Binding Protein family (CbpX), CbpX truncates, LytX family, LytX truncates, CbpX truncate-LytX truncate chimeric proteins (or fusions), pneumolysin (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 and Sp133. However, if CbpX is PspC, then the
10 second protein is not PspA or PsaA. Preferably, the immunogenic composition comprises 2 or more proteins selected from the group consisting of the Poly Histidine Triad family (PhtX), Choline Binding Protein family (CbpX), CbpX truncates, LytX family, LytX truncates, CbpX truncate-LytX truncate chimeric proteins (or fusions),
15 pneumolysin (Ply), PspA, PsaA, and Sp128. More preferably, the immunogenic composition comprises 2 or more proteins selected from the group consisting of the Poly Histidine Triad family (PhtX), Choline Binding Protein family (CbpX), CbpX truncates, LytX family, LytX truncates, CbpX truncate-LytX truncate chimeric proteins (or fusions), pneumolysin (Ply), and Sp128

20 The Pht (Poly Histidine Triad) family comprises proteins PhtA, PhtB, PhtD, and PhtE. The family is characterised by a lipidation sequence, two domains separated by a proline-rich region and several histidine triads, possibly involved in metal or nucleoside binding or enzymatic activity, (3-5) coiled-coil regions, a conserved N-terminus and a heterogeneous C terminus. It is present in all strains of
25 pneumococci tested. Homologous proteins have also been found in other Streptococci and Neisseria. Preferred members of the family comprise PhtA, PhtB and PhtD. More preferably, it comprises PhtA or PhtD. It is understood, however, that the terms Pht A, B, D, and E refer to proteins having sequences disclosed in the citations below as well as naturally-occurring (and man-made) variants thereof that have a sequence
30 homology that is at least 90% identical to the referenced proteins. Preferably it is at least 95% identical and most preferably it is 97% identical.

vaccine additionally comprises an adjuvant, which is preferably an inducer of a TH1 response.

In yet another related aspect is a method for making the vaccine of the invention by selecting and isolating 2 different *S. pneumoniae* proteins and mixing
5 both proteins with a pharmaceutically acceptable carrier.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

10 The present invention provides an improved vaccine for the prevention or amelioration of pneumococcal infection of the elderly (e.g., pneumonia) and/or in infants (e.g., Otitis media), by relying on a pneumococcal protein based-approach. In one preferred embodiment, the vaccine is suitable for the prevention or amelioration of pneumococcal infection of the elderly. As most adults have been exposed to
15 *Streptococcus pneumoniae*, the present vaccine is intended to boost the underlying immune response in adults and the elderly to protective levels by administration of at least 2 pneumococcal proteins identified in the present invention. The pneumococcal proteins are administered in the absence of *S. pneumoniae* polysaccharides.

In the context of the present invention a patient is considered elderly if they
20 are 55 years or over in age, typically over 60 years and more generally over 65 years. Thus in one embodiment the invention provides for a vaccine composition comprising pneumococcal proteins for the prevention of pneumonia in the elderly.

In another embodiment, the present invention provides a vaccine composition, suitable for use by infants (typically 0 to 2 years), comprising two or more
25 pneumococcal proteins identified in the present invention.

Pneumococcal Proteins of the Invention

The *Streptococcus pneumoniae* proteins of the invention are either surface exposed, at least during part of the life cycle of the pneumococcus, or are proteins
30 which are secreted or released by the pneumococcus. Preferably the combination of proteins of the invention are selected from 2 different categories such as proteins having a Type II Signal sequence motif of LXXC (where X is any amino acid, e.g.,

10

With regards to the PhtX proteins, PhtA is disclosed in WO 98/18930, and is also referred to Sp36. As noted above, it is a protein from the polyhistidine triad family and has the type II signal motif of LXXC.

5 PhtD is disclosed in WO 00/37105, and is also referred to Sp036D. As noted above, it also is a protein from the polyhistidine triad family and has the type II LXXC signal motif.

PhtB is disclosed in WO 00/37105, and is also referred to Sp036B. Another member of the PhtB family is the C3-Degrading Polypeptide, as disclosed in WO 00/17370. This protein also is from the polyhistidine triad family and has the type II
10 LXXC signal motif. A preferred immunologically functional equivalent is the protein Sp42 disclosed in WO 98/18930. A PhtB truncate (approximately 79kD) is disclosed in WO99/15675 which is also considered a member of the PhtX family.

PhtE is disclosed in WO00/30299 and is referred to as BVH-3.

Concerning the Choline Binding Protein family (CbpX), members of that
15 family were originally identified as pneumococcal proteins that could be purified by choline-affinity chromatography. All of the choline-binding proteins are non-covalently bound to phosphorylcholine moieties of cell wall teichoic acid and membrane-associated lipoteichoic acid. Structurally, they have several regions in common over the entire family, although the exact nature of the proteins (amino acid
20 sequence, length, etc.) can vary. In general, choline binding proteins comprise an N terminal region (N), conserved repeat regions (R1 and/or R2), a proline rich region (P) and a conserved choline binding region (C), made up of multiple repeats, that comprises approximately one half of the protein. As used in this application, the term "Choline Binding Protein family (CbpX)" is selected from the group consisting of
25 Choline Binding Proteins as identified in WO97/41151, PbcA, SpaA, PspC, CbpA, CbpD, and CbpG. CbpA is disclosed in WO97/41151. CbpD and CbpG are disclosed in WO00/29434. PspC is disclosed in WO97/09994. PbcA is disclosed in WO98/21337. SpaA is a Choline binding protein disclosed in WO 98/39450. Preferably the Choline Binding Proteins are selected from the group consisting of
30 CbpA, PbcA, SpaA and PspC.

Another preferred embodiment is CbpX truncates wherein "CbpX" is defined above and "truncates" refers to CbpX proteins lacking 50% or more of the Choline

binding region (C). Preferably such proteins lack the entire choline binding region. More preferably, the such protein truncates lack (i) the choline binding region and (ii) a portion of the N-terminal half of the protein as well, yet retain at least one repeat region (R1 or R2). More preferably still, the truncate has 2 repeat regions (R1 and R2). Examples of such preferred embodiments are NR1xR2 and R1xR2 as illustrated in WO99/51266 or WO99/51188, however, other choline binding proteins lacking a similar choline binding region are also contemplated within the scope of this invention.

The LytX family is membrane associated proteins associated with cell lysis. The N-terminal domain comprises choline binding domain(s), however the LytX family does not have all the features found in the CbpA family noted above and thus for the present invention, the LytX family is considered distinct from the CbpX family. In contrast with the CbpX family, the C-terminal domain contains the catalytic domain of the LytX protein family. The family comprises LytA, B and C. With regards to the LytX family, LytA is disclosed in Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). LytB is disclosed in WO 98/18930, and is also referred to as Sp46. LytC is also disclosed in WO 98/18930, and is also referred to as Sp91. A preferred member of that family is LytC.

Another preferred embodiment are LytX truncates wherein "LytX" is defined above and "truncates" refers to LytX proteins lacking 50% or more of the Choline binding region. Preferably such proteins lack the entire choline binding region. An example of such truncates can be found in the Examples section of this invention.

Yet another preferred embodiment of this invention are CbpX truncate-LytX truncate chimeric proteins (or fusions). Preferably this comprises NR1xR2 (or R1xR2) of CbpX and the C-terminal portion (Cterm, i.e., lacking the choline binding domains) of LytX (e.g., LytCCterm or Sp91Cterm). More preferably CbpX is selected from the group consisting of CbpA, PbcA, SpaA and PspC. More preferably still, it is CbpA. Preferably, LytX is LytC (also referred to as Sp91).

Another embodiment of the present invention is a PspA or PsaA truncates lacking the choline binding domain (C) and expressed as a fusion protein with LytX. Preferably, LytX is LytC.

11

Pneumolysin is a multifunctional toxin with a distinct cytolytic (hemolytic) and complement activation activities (Rubins et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med, 153:1339-1346 (1996)). The toxin is not secreted by pneumococci, but it is released upon lysis of pneumococci under the influence of autolysin. Its effects include e.g.,

5 the stimulation of the production of inflammatory cytokines by human monocytes, the inhibition of the beating of cilia on human respiratory epithelial, and the decrease of bactericidal activity and migration of neutrophils. The most obvious effect of pneumolysin is in the lysis of red blood cells, which involves binding to cholesterol. Because it is a toxin, it needs to be detoxified (i.e., non-toxic to a human when

10 provided at a dosage suitable for protection) before it can be administered *in vivo*. Expression and cloning of wild-type or native pneumolysin is known in the art. See, for example, Walker et al. (Infect Immun, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell et al. (Biochim Biophys Acta, 1007:67-72 (1989) and Mitchell et al (NAR, 18:4010 (1990)). Detoxification of ply can be conducted by chemical means, e.g., subject to

15 formalin or glutaraldehyde treatment or a combination of both. Such methods are well known in the art for various toxins. Alternatively, ply can be genetically detoxified. Thus, the invention encompasses derivatives of pneumococcal proteins which may be, for example, mutated proteins. The term "mutated" is used herein to mean a molecule which has undergone deletion, addition or substitution of one or more amino acids

20 using well known techniques for site directed mutagenesis or any other conventional method. For example, as described above, a mutant ply protein may be altered so that it is biologically inactive whilst still maintaining its immunogenic epitopes, see, for example, WO90/06951, Berry et al. (Infect Immun, 67:981-985 (1999)) and WO99/03884.

25 As used herein, it is understood that the term "Ply" refers to mutated or detoxified pneumolysin suitable for medical use (i.e., non toxic).

With regards to PsaA and PspA, both are known in the art. For example, PsaA and transmembrane deletion variants thereof have been described by Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255-62. PspA and transmembrane deletion variants

30 thereof have been disclosed in, for example, US 5804193, WO 92/14488, and WO 99/53940.

Sp128 and Sp130 are disclosed in WO00/76540.

Sp125 is an example of a pneumococcal surface protein with the Cell Wall Anchored motif of LPXTG (where X is any amino acid). Any protein within this class of pneumococcal surface protein with this motif has been found to be useful within the context of this invention, and is therefore considered a further protein of the invention. Sp125 itself is disclosed in WO 98/18930, and is also known as ZmpB – a zinc metalloproteinase.

Sp101 is disclosed in WO 98/06734 (where it has the reference # y85993). It is characterised by a Type I signal sequence.

Sp133 is disclosed in WO 98/06734 (where it has the reference # y85992). It is also characterised by a Type I signal sequence.

The proteins of the invention may also be beneficially combined. Preferred combinations include, but are not limited to, PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91Cterm chimeric or fusion proteins, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2-Sp91Cterm chimeric or fusion proteins, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Preferably, NR1xR2 (or R1xR2) is from CbpA or PspC. More preferably it is from CbpA.

A particularly preferred combination of pneumococcal proteins comprises Ply (or a truncate or immunologically functional equivalent thereof) + PhtD (or a truncate or immunologically functional equivalent thereof) + NR1xR2 (or R1xR2). Preferably, NR1xR2 (or R1xR2) is from CbpA or PspC. More preferably it is from CbpA.

The present invention also encompasses "immunologically functional equivalent(s)" to the proteins of the invention. "Immunologically functional equivalent(s)" is defined as a peptide or protein comprising at least one protective epitope from the proteins of the invention. Such epitopes are characteristically surface-exposed, highly conserved, and can elicit a bactericidal antibody response in a host or prevent toxic effects. Preferably, the functional equivalent has at least 15 and preferably 30 or more contiguous amino acids from the protein of the invention can be used with the proviso that they are capable of raising substantially the same immune response as the native protein. The position of potential B-cell epitopes in a protein

sequence may be readily determined by identifying peptides that are both surface-exposed and antigenic using a combination of two methods: 2D-structure prediction and antigenic index prediction. The 2D-structure prediction can be made using the PSIPRED program (from David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK). The antigenic index can be calculated on the basis of the method described by Jameson and Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]).

The present invention has advantages over *S. pneumoniae* polysaccharide vaccines in that multiple *S. pneumoniae* protein (immunogenic) compositions may include greater cross-protection across the numerous serotypes, can further inhibit adherence and colony formulation, and can potentially can raise antibodies that can neutralise the toxic/enzymatic functions of a pathogen. Furthermore, additional surface antigens provide a means to further stimulate opsonophagocytosis.

The present invention also contemplates combination vaccines which provide protection against a range of different pathogens. Many Paediatric vaccines are now given as a combination vaccine so as to reduce the number of injections a child has to receive. Thus for Paediatric vaccines other antigens from other pathogens may be formulated with the vaccines of the invention. For example the vaccines of the invention can be formulated with (or administered separately but at the same time) the well known 'trivalent' combination vaccine comprising Diphtheria toxoid (DT), tetanus toxoid (TT), and pertussis components [typically detoxified Pertussis toxoid (PT) and filamentous haemagglutinin (FHA) with optional pertactin (PRN) and/or agglutinin 1+2], for example the marketed vaccine INFANRIX-DTPa™ (SmithKlineBeecham Biologicals) which contains DT, TT, PT, FHA and PRN antigens, or with a whole cell pertussis component for example as marketed by SmithKlineBeecham Biologicals s.a., as Tritanrix™. The combined vaccine may also comprise other antigen, such as Hepatitis B surface antigen (HBsAg), Polio virus antigens (for instance inactivated trivalent polio virus - IPV), *Moraxella catarrhalis* outer membrane proteins, non-typeable *Haemophilus influenzae* proteins, *N.meningitidis* B outer membrane proteins.

Examples of preferred *Moraxella catarrhalis* protein antigens which can be included in a combination vaccine (especially for the prevention of otitis media) are:

OMP106 [WO 97/41731 (Antex) & WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA &/or LbpB [WO 98/55606 (PMC)]; TbpA &/or TbpB [WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, *et al.* (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 and/or UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR
 5 (PCT/EP99/03824); PilQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); lipo06 (GB 9917977.2); lipo10 (GB 9918208.1); lipo11 (GB 9918302.2); lipo18 (GB 9918038.2); P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); OmpLA1 (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257); and OmpE. Examples of non-typeable *Haemophilus influenzae* antigens which can be included in a combination vaccine
 10 (especially for the prevention of otitis media) include: Fimbrin protein [(US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] and fusions comprising peptides therefrom [eg LB1(f) peptide fusions; US 5843464 (OSU) or WO 99/64067]; OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [EP 281673 (State University of New York)]; TbpA and/or TbpB; Hia; Haf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (WO
 15 94/12641); protein D (EP 594610); P2; and P5 (WO 94/26304).

In another embodiment, various antigens recited above can be included in the immunogenic composition of the invention as antigens present on the surface of outer membrane vesicles (blebs) made from the bacteria from which it is derived.

Other combinations contemplated are the *S. pneumoniae* proteins of the
 20 invention in combination with viral antigens, for example, from influenza (attenuated, split, or subunit [e.g., surface glycoproteins neuraminidase (NA) and haemagglutinin (HA). See, e.g., Chaloupka I. *et al.*, Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15:121-127], RSV (e.g., F and G antigens or F/G fusions, see, eg, Schmidt A. C. *et al.*, J Virol, May 2001, p4594 - 4603), PIV3 (e.g., HN and F proteins, see Schmidt *et al.*
 25 *supra*), Varicella (e.g., attenuated, glycoproteins I-V, etc.), and any (or all) component(s) of MMR (measles, mumps, rubella).

Polysaccharide Antigens of the Invention

The present application also contemplates combination vaccines with 2 or
 30 more *S. pneumoniae* proteins combined with polysaccharides other than from *S. pneumoniae*. Such polysaccharides can be isolated from, for example, *H. influenzae*, *H. influenzae* type B (Hib), *N. meningitidis* groups A, C, W, Y, Streptococci other

than *S. pneumoniae* (e.g., Group B Streptococcus, *S. pyogenes*, etc.), Staphylococcus (e.g., *S. aureus*, *S. epidermidis*), *E. coli*, Enterococcus (e.g., *E. faecalis* and *E. faecium*), etc. Preferably the polysaccharides are from *H. influenzae* type B (Hib), and/or *N. meningitidis* groups A, C, W135, and/or Y.

5 As mentioned above, a problem associated with the polysaccharide approach to vaccination, is the fact that polysaccharides *per se* are poor immunogens. To overcome this, polysaccharides may be conjugated to protein carriers, which provide bystander T-cell help. It is preferred, therefore, that the polysaccharides utilised in the invention are linked to such a protein carrier. Examples of such carriers which are
10 currently commonly used for the production of polysaccharide immunogens include the Diphtheria and Tetanus toxoids (DT, DT CRM197, other DT mutants, e.g. position Glu-148, etc. [see, e.g., US 4,709,017, WO93/25210, WO95/33481, etc.] and TT (and TT fragment C) respectively), Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), OMPC from *N. meningitidis*, and the purified protein derivative of Tuberculin (PPD).

15 Another carrier for the polysaccharide based immunogenic compositions (or vaccines) is protein D from *Haemophilus influenzae* (EP 594610-B), or fragments thereof. Fragments suitable for use include fragments encompassing T- helper epitopes. In particular a protein D fragment will preferably contain the N-terminal 1/3 of the protein.

20 The polysaccharide may be linked to the carrier protein by any known method (for example, by Likhite, U.S. Patent 4,372,945 and by Armor *et al.*, U.S. Patent 4,474,757). Preferably, CDAP conjugation is carried out (WO 95/08348). To enhance immunogenicity, the polysaccharides may be sized (depolymerized), adjuvanted, lyophilised, or be conjugated to different carrier proteins.

25

TH1 Adjuvants of the Invention

The vaccines of the present invention are preferably adjuvanted. Suitable adjuvants include an aluminium salt such as aluminium hydroxide gel (alum) or aluminium phosphate, but may also be a salt of calcium, magnesium, iron or zinc, or
30 may be an insoluble suspension of acylated tyrosine, or acylated sugars, cationically or anionically derivatised polysaccharides, or polyphosphazenes.

It is preferred that the adjuvant be selected to be a preferential inducer of a TH1 type of response. Such high levels of Th1-type cytokines tend to favour the induction of cell mediated immune responses to a given antigen, whilst high levels of Th2-type cytokines tend to favour the induction of humoral immune responses to the antigen.

It is important to remember that the distinction of Th1 and Th2-type immune response is not absolute. In reality an individual will support an immune response which is described as being predominantly Th1 or predominantly Th2. However, it is often convenient to consider the families of cytokines in terms of that described in murine CD4 +ve T cell clones by Mosmann and Coffman (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Traditionally, Th1-type responses are associated with the production of the INF- γ and IL-2 cytokines by T-lymphocytes. Other cytokines often directly associated with the induction of Th1-type immune responses are not produced by T-cells, such as IL-12. In contrast, Th2-type responses are associated with the secretion of IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Suitable adjuvant systems which promote a predominantly Th1 response include: Monophosphoryl lipid A or a derivative thereof, particularly 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A (3D-MPL) (for its preparation see GB 2220211 A); and a combination of monophosphoryl lipid A, preferably 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A; together with either an aluminium salt (for instance aluminium phosphate or aluminium hydroxide) or an oil-in-water emulsion. In such combinations, antigen and 3D-MPL are contained in the same particulate structures, allowing for more efficient delivery of antigenic and immunostimulatory signals. Studies have shown that 3D-MPL is able to further enhance the immunogenicity of an alum-adsorbed antigen [Thoelen *et al.* Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454-B1].

An enhanced system involves the combination of a monophosphoryl lipid A and a saponin derivative, particularly the combination of QS21 and 3D-MPL as disclosed in WO 94/00153, or a less reactogenic composition where the QS21 is quenched with cholesterol as disclosed in WO 96/33739.

14

A particularly potent adjuvant formulation involving QS21, 3D-MPL and tocopherol in an oil in water emulsion is described in WO 95/17210, and is a preferred formulation.

Preferably the vaccine additionally comprises a saponin, more preferably QS21. The formulation may also comprise an oil in water emulsion and tocopherol (WO 95/17210).

The present invention also provides a method for producing a vaccine formulation comprising mixing a protein of the present invention together with a pharmaceutically acceptable excipient, such as 3D-MPL.

Unmethylated CpG containing oligonucleotides (WO 96/02555) are also preferential inducers of a TH1 response and are suitable for use in the present invention.

In a further aspect of the present invention there is provided a vaccine as herein described for use in medicine. In one embodiment there is a method of preventing or ameliorating pneumonia in an elderly human comprising administering a safe and effective amount of a vaccine of the invention, and optionally a Th1 adjuvant, to said elderly patient.

In a further embodiment there is provided a method of preventing or ameliorating otitis media in Infants (up to 24 months) or toddlers (typically 24 months to 5 years), comprising administering a safe and effective amount of a vaccine comprising a *Streptococcus pneumoniae* proteins of the invention and optionally a Th1 adjuvant, to said Infant or toddler.

Vaccine Preparations of the Invention

The vaccine preparations of the present invention may be used to protect or treat a mammal (preferably a human patient) susceptible to infection, by means of administering said vaccine via systemic or mucosal route. These administrations may include injection via the intramuscular, intraperitoneal, intradermal or subcutaneous routes; or via mucosal administration to the oral/alimentary, respiratory, genitourinary tracts. Intranasal administration of vaccines for the treatment of pneumonia or otitis media is preferred (as nasopharyngeal carriage of pneumococci can be more effectively prevented, thus attenuating infection at its earliest stage). Although the

vaccine of the invention may be administered as a single dose, components thereof may also be co-administered together at the same time or at different times (for instance if polysaccharides are present in a vaccine these could be administered separately at the same time or 1-2 weeks after the administration of the bacterial protein combination for optimal coordination of the immune responses with respect to each other). In addition to a single route of administration, 2 different routes of administration may be used. For example, viral antigens may be administered ID (intradermal), whilst bacterial proteins may be administered IM (intramuscular) or IN (intranasal). If polysaccharides are present, they may be administered IM (or ID) and bacterial proteins may be administered IN (or ID). In addition, the vaccines of the invention may be administered IM for priming doses and IN for booster doses.

The amount of conjugate antigen in each vaccine dose is selected as an amount which induces an immunoprotective response without significant, adverse side effects in typical vaccines. Such amount will vary depending upon which specific immunogen is employed and how it is presented. The content of protein antigens in the vaccine will typically be in the range 1-100µg, preferably 5-50µg, most typically in the range 5 - 25µg. If polysaccharides are included, generally it is expected that each dose will comprise 0.1-100 µg of polysaccharide, preferably 0.1-50 µg, more preferably 0.1-10 µg, of which 1 to 5 µg is the most preferable range.

Optimal amounts of components for a particular vaccine can be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects may receive one or several booster immunisations adequately spaced. Typically a vaccine will comprise antigen (proteins), an adjuvant, and excipients or a pharmaceutically acceptable carrier.

Vaccine preparation is generally described in Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). Encapsulation within liposomes is described by Fullerton, US Patent 4,235,877.

Although the vaccines of the present invention may be administered by any route, administration of the described vaccines into the skin (ID) forms one embodiment of the present invention. Human skin comprises an outer "horny" cuticle, called the stratum corneum, which overlays the epidermis. Undemeath this

15

epidermis is a layer called the dermis, which in turn overlays the subcutaneous tissue. Researchers have shown that injection of a vaccine into the skin, and in particular the dermis, stimulates an immune response, which may also be associated with a number of additional advantages. Intradermal vaccination with the vaccines described herein
5 forms a preferred feature of the present invention.

The conventional technique of intradermal injection, the "mantoux procedure", comprises steps of cleaning the skin, and then stretching with one hand, and with the bevel of a narrow gauge needle (26-31 gauge) facing upwards the needle is inserted at an angle of between 10-15°. Once the bevel of the needle is inserted, the barrel of the
10 needle is lowered and further advanced whilst providing a slight pressure to elevate it under the skin. The liquid is then injected very slowly thereby forming a bleb or bump on the skin surface, followed by slow withdrawal of the needle.

More recently, devices that are specifically designed to administer liquid agents into or across the skin have been described, for example the devices described
15 in WO 99/34850 and EP 1092444, also the jet injection devices described for example in WO 01/13977; US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520, 639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 and WO
20 97/13537. Alternative methods of intradermal administration of the vaccine preparations may include conventional syringes and needles, or devices designed for ballistic delivery of solid vaccines (WO 99/27961), or transdermal patches (WO 97/48440; WO 98/28037); or applied to the surface of the skin (transdermal or transcutaneous delivery. WO 98/20734 ; WO 98/28037).

25 When the vaccines of the present invention are to be administered to the skin, or more specifically into the dermis, the vaccine is in a low liquid volume, particularly a volume of between about 0.05 ml and 0.2 ml.

The content of antigens in the skin or intradermal vaccines of the present invention may be similar to conventional doses as found in intramuscular vaccines.
30 Accordingly, the protein antigens present in the intradermal vaccines may in the range 1-100µg, preferably 5-50µg. Likewise, if present, the amount of polysaccharide conjugate antigen in each vaccine dose is generally expected to comprise 0.1-100 µg

of polysaccharide, preferably 0.1-50 µg, preferably 0.1-10 µg, and may be between 1 and 5 µg. However, it is a feature of skin or intradermal vaccines that the formulations may be "low dose". Accordingly the protein antigens in "low dose" vaccines are preferably present in as little as 0.1 to 10µg, preferably 0.1 to 5 µg per dose; and if present the polysaccharide conjugate antigens may be present in the range of 0.01-1µg, and preferably between 0.01 to 0.5 µg of polysaccharide per dose.

As used herein, the term "intradermal delivery" means delivery of the vaccine to the region of the dermis in the skin. However, the vaccine will not necessarily be located exclusively in the dermis. The dermis is the layer in the skin located between about 1.0 and about 2.0 mm from the surface in human skin, but there is a certain amount of variation between individuals and in different parts of the body. In general, it can be expected to reach the dermis by going 1.5 mm below the surface of the skin. The dermis is located between the stratum corneum and the epidermis at the surface and the subcutaneous layer below. Depending on the mode of delivery, the vaccine may ultimately be located solely or primarily within the dermis, or it may ultimately be distributed within the epidermis and the dermis.

In another aspect of the invention, the present invention may contain DNA encoding one or more *S. pneumoniae* proteins, such that the protein is generated in situ. The DNA may be present within any of a variety of delivery systems known to those of ordinary skill in the art, including nucleic acid expression systems, bacteria and viral expression systems. Numerous gene delivery techniques are well known in the art, such as those described by Rolland, (Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198, 1998) and references cited therein. Appropriate nucleic acid expression systems contain the necessary DNA sequences for expression in the patient (such as a suitable promoter and terminating signal). When the expression system is a recombinant live microorganism, such as a virus or bacterium, the gene of interest can be inserted into the genome of a live recombinant virus or bacterium. Inoculation and in vivo infection with this live vector will lead to in vivo expression of the antigen and induction of immune responses. Viruses and bacteria used for this purpose are for instance: poxviruses (e.g; vaccinia, fowlpox, canarypox), alphaviruses (Sindbis virus, Semliki Forest Virus, Venezuelan Equine Encephalitis Virus), adenoviruses, adeno-

associated virus, picornaviruses (poliovirus, rhinovirus), herpesviruses (varicella zoster virus, etc), *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Neisseria*, BCG. These viruses and bacteria can be virulent, or attenuated in various ways in order to obtain live vaccines. Such live vaccines also form part of the invention.

- 5 In a further aspect of the present invention there is provided a method of manufacture of a vaccine formulation as herein described, wherein the method comprises mixing a combination of proteins according to the invention.

- 10 Preferably the antigenic compositions (and vaccines) that contain polysaccharides hereinbefore described are lyophilised up until they are about to be used, at which point they are extemporaneously reconstituted with diluent. More preferably they are lyophilised in the presence of 3D-MPL, and are extemporaneously reconstituted with saline solution.

- 15 The lyophilisation of vaccines is well known in the art. Typically the liquid vaccine is freeze dried in the presence of an anti-caking agent for instance sugars such as sucrose or lactose (present at an initial concentration of 10-200 mg/mL). Lyophilisation typically occurs over a series of steps, for instance a cycle starting at -69 °C, gradually adjusting to -24 °C over 3 hours, then retaining this temperature for 18 hours, then gradually adjusting to -16 °C over 1 hour, then retaining this
20 temperature for 6 hours, then gradually adjusting to +34 °C over 3 hours, and finally retaining this temperature over 9 hours.

The immunogenic compositions and vaccines of the invention can be evaluated in various animal models or with human sera. As an illustration, the following animal models can be used to evaluate pneumococcal infection. C3H/HeJ Mice (6 to 8 week old) can be immunised s.c. with 15 µg protein adjuvanted with 50 µl CFA, followed 3-4 weeks later by boosting with 15 µg protein with IFA. For demonstrating passive and active protection from systemic infection, mice can be administered intraperitoneally with immune sera or proteins prior to challenge by intraperitoneal injection with 15 to 90 LD50 pneumococci on week 8-10. Additionally, proteins can be tested in a mouse nasopharynx colonization model by (Wu et al Microbial Pathogenesis 1997; 23:127-137).

In addition to mice, infant rats are susceptible to colonisation and infection by *S. pneumoniae*. In passive protective studies, administration of mouse immune sera (100 µl i.p. or 10 µl i.n.) can be done prior to challenge with intranasal administration of *S.pneumoniae* (10 µl) in 2-5 day old infant rat pups. Colonisation can be determined by plating nasal washes (20-40 µl instilled, 10 µl withdrawn).

Favourable interactions between the protein components of the combination vaccine may be demonstrated by administering a dose of each protein in the vaccine which would be sub-protective in a monovalent vaccine. Increased protective efficacy of the combination vaccine compared to monovalent vaccines can be attributed to a favourable interaction between the components.

The invention is illustrated in the accompanying examples. The examples are carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail. The examples are meant to illustrate, but not limit the invention.

EXAMPLES

Example 1. Construction and Expression of Antigens

NR1xR2

CbpA is a 75kDa surface-exposed protein consisting of several domains. The N-terminal domain comprises 2 highly conserved repeats (R1 and R2) and the C-

18

terminal domain comprises 10 tandem, direct repetitive sequences of 20 amino acids. A CbpA truncate was prepared to produce NR1XR2, i.e., without the choline binding domain.

5 The NR1XR2 gene was amplified, via PCR, from DNA obtained from a serotype 4 strain of *S. pneumoniae* (see, e.g., WO97/41157, or WO99/51266). PCR was performed with the Expand High Fidelity PCR System, or Hi-Fi (Roche). It's composed of a mix containing Taq polymerase and a proofreading polymerase. Due to the inherent 3'-5' exonuclease proofreading activity, the use of Hi-Fi results in a 3 fold increased fidelity of DNA synthesis compared to Taq polymerase.

10 PCR fragments were cloned in pGEM-T vector from pGEM-T Vector Systems (Promega). This step is needed to facilitate restriction enzyme digestion of PCR fragment for future ligation. pGEM-T vector is provided linear and contains 3'-T overhangs. These overhangs facilitate insertion of PCR products generated by thermostable polymerases that add a single deoxyadenosine, in a template-independent fashion, to the 3' ends of the amplified fragment.

15 Fragments and vectors were purified after enzymatic digestions (*NdeI* and *XbaI* digestions) according to the article of Benore-Parsons *et al.* (Nucleic Acids research, 23, 4926-4927, 1995). Agarose slice was completely lyophilized during 3-4 hours. A 1:1 ethanol-TE solution was added to the lyophilized gel. The sample was gently mixed for 1h, the agarose was compressed and completely removed by centrifugation. DNA was recovered from the eluant by ethanol precipitation.

The DNA encoding NR1XR2 was cloned into a vector containing long promoter L from phage λ . The protein of interest could be induced by heat when present in AR 58 *E.coli* strain, or by nalidixic acid in AR 120 *E.coli* strain.

25 A preculture of bacteria was made overnight at 30°C. This preculture was diluted about 40 times in a total volume of 20 ml and put at 30°C until an O.D. of 0.4-0.6. Then, heat induction was made at 42°C. Samples were taken at different time points. One ml of culture was centrifuged 5 minutes at 7000 rpm. Culture supernatant was conserved at -20°C and pellet (total extract) was resuspended in 500 μ l of sample buffer (western blot or SDS-PAGE analysis), or in 500 μ l of lysis buffer and incubated 30 minutes at 37°C (ELISA). The composition of lysis buffer is: SDS 0.1%, Deoxycholate 0.1%, Na citrate: 0.015 M.

Samples were run on a SDS-PAGE, loaded on 4-20 % gel (Novex, Invitrogen). Migration was done at 200 V. Coomassie blue staining was performed. Samples were loaded on 4-20 % gel (Novex, Invitrogen) for Western Blotting. Migration was done at 200 V. Gel was transferred on nitrocellulose and spots were revealed with rabbit α -NR1XR2 polyclonal antibodies (first antibody) and a α -rabbit antibody coupled to alkaline phosphatase (second antibody).

A band of approximately 55kDa was observed by SDS-PAGE analysis. A clone, 28B2, was chosen on basis of the SDS-PAGE analysis and transferred to fermentation. This clone was sequenced and its sequence was confirmed (amino acids 39 (i.e., after signal sequence) to 446 = 406 amino acids).

The solubility of NR1XR2 was also studied, after lysis of overnight-induced bacteria followed by centrifugation. A SDS-PAGE analysis and an ELISA test were performed. NR1XR2 appeared to be mainly (> 95%) recovered in the soluble fraction.

15 *R1xR2, PhtD, Sp91, (N)R1xR2-Sp91[C-terminal domain], and Phx*

These genes were also cloned, sequenced and expressed in a similar manner to NR1xR2. R1xR2 contains amino acids 177 to 443 of CbpA (of *S. pneumoniae* serotype 4N), PhtD contains amino acids 21 (i.e., after signal sequence) to the end (amino acid 839 of *S. pneumoniae* serotype 4N), Sp91 starts at amino acid 20 (VAA) till the end. For the fusion proteins, R1xR2-Sp91Cterm contains amino acids 177-446 of CbpA and amino acids 271 until the translation stop; NR1xR2-Sp91Cterm contains amino acids 39-446 of CbpA and amino acids 271 until the translation stop. For both fusion proteins, 2 additional amino acids (GS) are found between the (N)R1xR2 and Sp91Cterm sequences. For all constructs, an ATG has been introduced 5' of the gene start to allow transcription and translation, which means that there is an additional N-terminus methionine in front of each sequence mentioned above.

Example 2. Serology

30 Using sera from clinical studies, ELISAs were measured for the antibody response that naturally developed to *S. pneumoniae* proteins.

2.1 EXPERIMENTAL PROCEDURE

- Serum samples

- Paired sera of infants collected when they were 2 to 4 months old and 6 to 12 months old, respectively (N = 20, studies DTPa HBV).
- Sera of ~20-year-old adults (N = 50).
- Sera of ≥ 65-year-old adults (N = 140).

- ELISA procedures

10

Immuno-plates were coated overnight at 4°C with 1 µg/ml of each protein. Serial two-fold dilutions of sera (starting at a 1/10th dilution) were then incubated for 1 hour at room temperature (RT) under shaking. Immuno-detection was done using a peroxidase-coupled anti-human IgG monoclonal antibody (Strateck, HP6043) diluted 4000-fold and incubated for 30 minutes at RT under shaking. After revelation, mid-point titers were calculated by SoftMaxPro. Sera with titers ≥ 10 were considered as positive. For the geometric mean calculation, a titer of 5 (half of the cut-off) was arbitrarily attributed to negative sera.

20 IgG concentrations expressed as µg/ml were established by comparing sample optical densities (OD) to the OD curve of chromopure IgG (Jackson) entrapped on the plate by polyclonal anti-human IgG goat antibodies and revealed by the same peroxidase-labeled antibody as above.

25 2.2 RESULTS

2.2.1 Strep protein serology in infants

The highest antibody titers and seropositivity rates measured in sera of 2 to 4-month-old infants were obtained with PhtD, PsaA, Sp128, NR1xR2 and in a lesser extent, with Sp91 and Ply. No or low responses to Sp101 and Sp130 were detected. Sp46 and PhtA were not tested (material availability issue).

The antibody responses generally decreased in sera of the same subjects collected when these were 6 to 12 months old, suggesting the high titers were mainly due to passively transferred maternal antibodies.

35 However, in certain infants, the immune response to some proteins increased with age, probably as a consequence of natural exposure to pneumococci. The antigen

mainly concerned by this seroconversion was clearly PsaA. Depending on the subject augmentation of antibody levels to PhtD, NR1xR2, Sp128, Sp91 and Ply was also shown. Only marginal variation in the humoral response to Sp101 and Sp130 was observed. (See figures 1 and 2)

5

2.2.2 Strep protein serology in young adults

According to the geometric mean titers, PhtD, PhtA and NR1xR2 are the most immunogenic proteins in the young adult population evaluated, then followed by Sp128, Ply and Sp91. All subjects had detectable antibodies to these proteins. Lower responses were measured to Sp46, and especially to Sp130 and Sp101. PsaA was not tested (not enough serum available). (See figures 3 and 4)

10

2.2.3 Strep protein serology in elderly adults

There was a clear decrease of the antibody levels to Strep proteins in elderly humans compared to young adults. In aged people, the best immunogen is PhtD, followed by Sp128, NR1xR2, Sp91, Ply and PsaA. Only marginal responses were measured to Sp101 and Sp130. Sp46 and PhtA were not tested (material availability issue). (See figures 5 and 6)

15

20 Table 1, Geometric mean IgG concentrations (GMC), expressed as $\mu\text{g/ml}$, in elderly people

Protein	IgG (GMC, $\mu\text{g/ml}$)
PhtD	19
NR1xR2	3.5
Sp91	2.5
Ply	2.3

All publications, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as though fully set forth.

25

While the preferred embodiments of the invention are illustrated by the above, it is to be understood that the invention is not limited to the precise instructions herein

30

disclosed and that the right to all modifications coming within the scope of the following claims is reserved.

:

Claims:

1. An immunogenic composition comprising at least 2 *S. pneumoniae* proteins selected from the group consisting of Poly Histidine Triad family (PhtX), Choline Binding Protein family (CbpX), CbpX truncates, LytX family, LytX truncates, CbpX truncate-LytX truncate chimeric proteins, pneumolysin (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 and Sp133.
2. The immunogenic composition of claim 1 comprising a protein from the polyhistidine triad family (PhtX) and another protein selected from the group consisting of Choline Binding Protein family (CbpX), CbpX truncates, LytX family, LytX truncates, CbpX truncate-LytX truncate chimeric proteins, pneumolysin (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 and Sp133.
3. The immunogenic composition of claim 1 comprising a protein selected from the group consisting of Choline Binding Protein family (CbpX), CbpX truncates, and CbpX truncate-LytX truncate chimeric proteins and another protein selected from the group consisting of polyhistidine triad family (PhtX), LytX family, pneumolysin (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 and Sp133.
4. The immunogenic composition of claims 1-3 wherein PhtX is PhtA, PhtB or PhtD.
5. The immunogenic composition of claims 1-4 wherein CbpX is CbpA or PspC.
6. The immunogenic composition of claims 1-5 additionally comprising an adjuvant.
7. A vaccine comprising the immunogenic composition of claim 6.
8. A method of eliciting an immune response by immunising a mammal with the immunogenic composition of claims 1-6.
9. A method of preventing or ameliorating Streptococcus infection in patients over 55 years of age, comprising administering a safe and effective amount of the vaccine of claim 7 to said patients.
10. Use of the vaccine of claim 7 in the manufacture of a medicament for prevention of pneumonia in patients over 55 years of age.
11. A method of preventing or ameliorating Otitis media in infants, comprising administering a safe and effective amount of the vaccine of claim 7 to said patients.
12. A method of making a vaccine as claimed in claim 7 comprising the steps of: selecting and isolating two different *S. pneumonia* proteins; and mixing said proteins together with a pharmaceutically acceptable carrier.

Figure 1, seropositivity % in infants

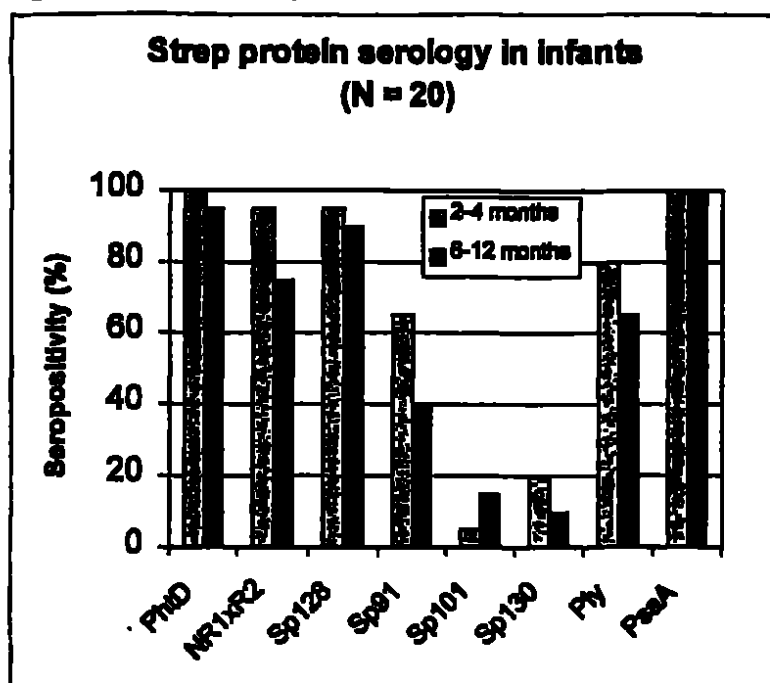
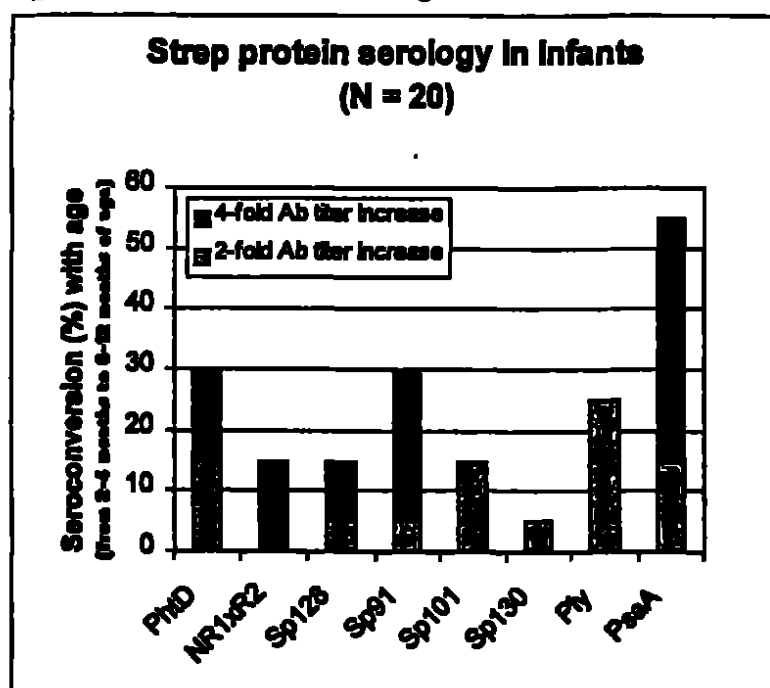


Figure 2, seroconversion with age in infants



21

Figure 3, mid-point titers in young adults

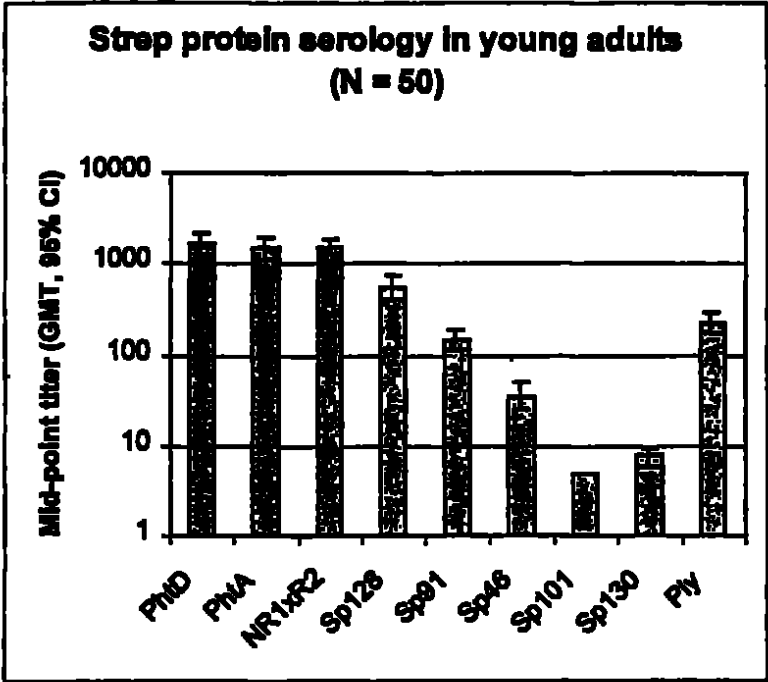
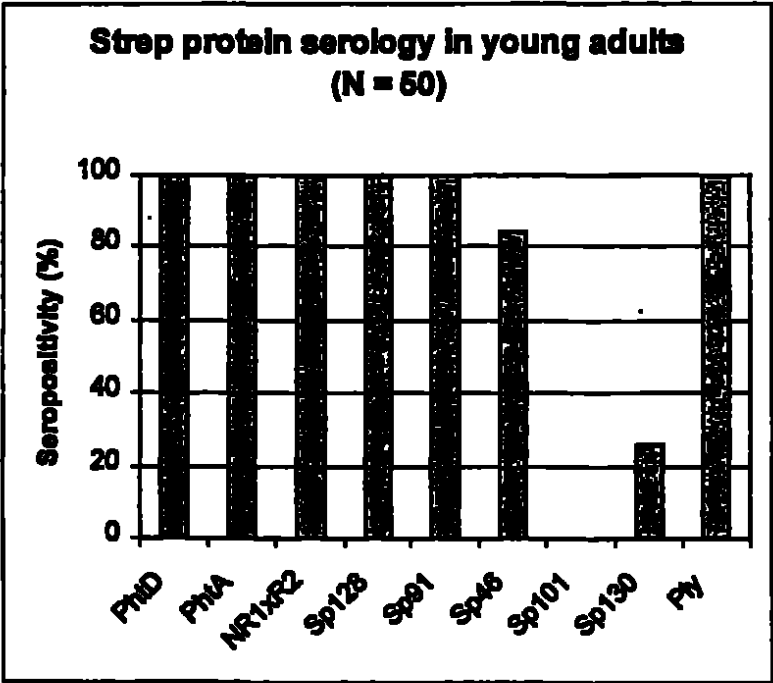


Figure 4, seropositivity % in young adults



22

Figure 5, mid-point titers in elderly people

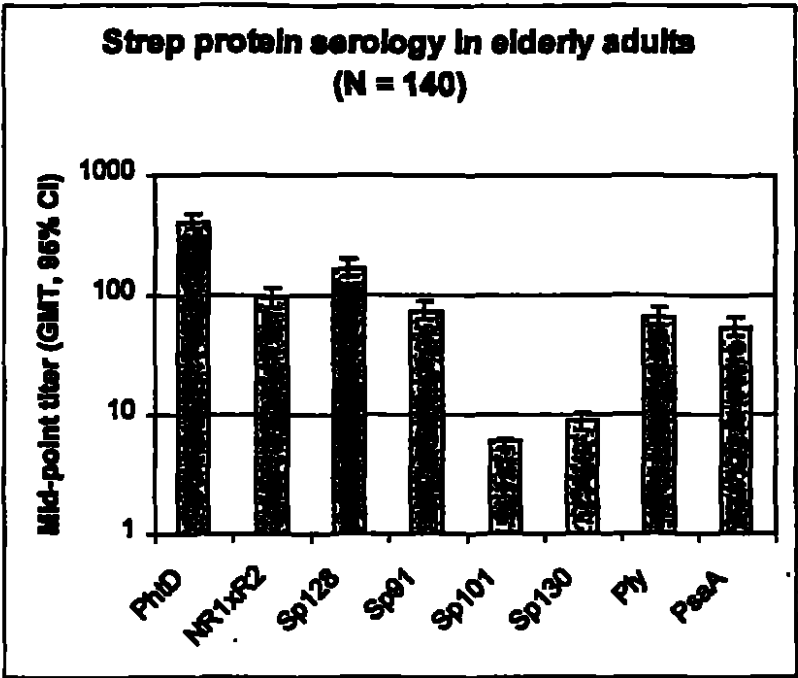
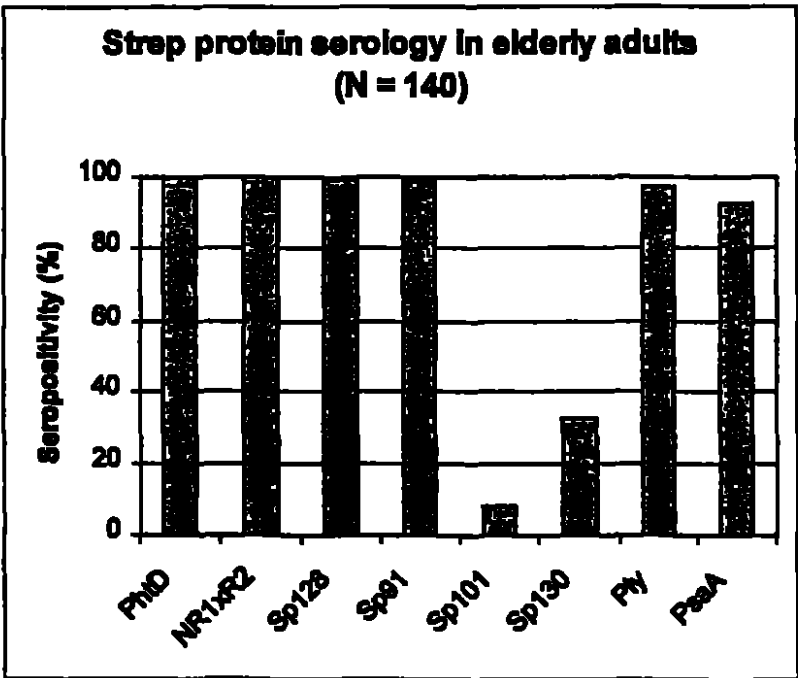


Figure 6, Seropositivity % in elderly people



VACUNA

5 CAMPO DEL INVENTO

El presente invento se relaciona con la combinación de dos o más proteínas de *S. pneumoniae*, su fabricación y uso en medicina como una vacuna. Tales combinaciones son particularmente útiles para la protección de bebés y personas de la tercera edad contra infección por estreptococo.

FUNDAMENTO DEL INVENTO

El *streptococcus pneumoniae* es una bacteria gram positiva responsable de considerable morbilidad y mortalidad (particularmente en jóvenes y personas de la tercera edad), produciendo enfermedades invasivas tales como la neumonía, bacteremia y meningitis, y enfermedades asociadas con colonización, tales como otitis media aguda. La tasa de neumonía por pneumococo en Estados Unidos para personas de 60 años se estima entre 3 y 8 por 100.000. En 20% de los casos esto lleva a bacteremia, y otras manifestaciones tales como meningitis, con una tasa de mortalidad cercana a 30% aún con tratamiento antibiótico.

El neumococo está encapsulado con un polisacárido químicamente enlazado el cual le confiere la especificidad de serotipo. Existen 90 serotipos conocidos de neumococos, y la cápsula es el determinante de virulencia de origen para los neumococos, puesto que no solamente protege la superficie interior de la bacteria del complemento, sino que ella misma es deficientemente inmunogénica. Los polisacáridos son antígenos T-independientes, y no pueden ser procesados o

presentados sobre moléculas MHC para interactuar con células-T. Sin embargo éstos pueden estimular el sistema inmune a través de un mecanismo alterno el cual involucra entrecruzamiento de receptores de superficie sobre células B.

5 Se mostró en varios experimentos que la protección contra enfermedad por neumococos invasivos está relacionada más fuertemente con el anticuerpo específico para la cápsula, y la protección es serotipo específica.

10 El *Streptococcus pneumoniae* es la causa más común de enfermedad bacteriana invasiva y otitis media en bebés y niños de corta edad. Igualmente, las personas de la tercera edad mostraron respuestas deficientes a vacunas de pneumococo [Roghmann, (1987), J. Gerontol. 42:265-270], de aquí la incidencia aumentada de neumonía bacteriana en esta población
15 [Vergheze y Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].

Una vacuna de pneumococo no conjugada 23-valente ha mostrado una amplia variación en eficacia clínica, entre 0% y 81% (Fedson (1994) Arch Intern Med. 154: 2531-2535). La eficacia parece estar relacionada con el grupo de riesgo que
20 se está inmunizado, tales como personas de la tercera edad, enfermedad de Hodgkin, esplenectomía, enfermedad de células falciformes y agamaglobulinémicos (Fine (1994) Arch Intern Med. 154:2666-2677), y también con la manifestación de la enfermedad. La vacuna 23-valente no demuestra protección
25 contra enfermedades como neumonía por pneumococo (en ciertos grupos de alto riesgo tales como las personas de la tercera edad) y otitis media.

Las estrategias que han sido diseñadas para superar esta carencia de inmunogenicidad en niños, incluyen el enlace del
30 polisacárido a grandes proteínas inmunogénicas, lo cual proporciona ayuda de células-T circundantes e induce memoria inmunológica contra el antígeno polisacárido con el cual

están conjugadas.

Por lo tanto existe la necesidad de composiciones de vacunas de pneumococo mejoradas, particularmente aquellas que serán más efectivas para la prevención o alivio de enfermedad por pneumococo (particularmente neumonía) en la tercera edad y en niños de corta edad.

El presente invento proporciona tal vacuna mejorada.

RESUMEN DEL INVENTO

10 En un aspecto, el presente invento es una composición inmunológica que comprende al menos dos proteínas de *S. pneumoniae* seleccionadas del grupo consta de la familia de tríada de polihistidina (phtX), la familia de proteínas de unión de colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, 15 truncados LytX, proteínas quiméricas de truncados CbpX-truncado-LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133. En una realización preferida, una de las proteínas es de la familia de triada de polihistidina (PhtX).

20 En un aspecto relacionado, el presente invento proporciona una vacuna para tratar o mejorar otitis media en bebés o neumonía en personas de la tercera edad. Opcionalmente la vacuna adicionalmente comprende un coadyuvante, el cual preferiblemente es un inductor de una 25 respuesta TH1.

Otro aspecto relacionado es un método para fabricar la vacuna del invento seleccionando y aislando dos proteínas diferentes de *S. pneumoniae* y mezclando ambas proteínas con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

DESCRIPCIÓN DEL INVENTO

El presente invento proporciona una vacuna mejorada para

la prevención o alivio de infección por pneumococo en personas de la tercera edad (ejemplo, neumonía) y/o en bebés (ejemplo, otitis media), que depende de una enfoque basado en proteínas neumocóccicas. En una realización preferida, la
5 vacuna es apropiada para la prevención o alivio de infección por pneumococo en la tercera edad. Puesto que la mayoría de adultos han estado expuestos a streptococcus pneumoniae, esta vacuna está diseñada para aumentar la respuesta inmune subyacente en adultos y personas de la tercera edad hasta
10 niveles protectores mediante la administración de al menos dos proteínas neumocóccicas identificadas en el presente invento. Las proteínas neumocóccicas son administradas en ausencia de polisacáridos de *S. pneumoniae*.

En el contexto del presente invento un paciente es
15 considerado de la tercera edad si tiene 55 o más años, típicamente más de 60 años y más generalmente más de 65 años. Así en una realización del presente invento se proporciona una composición de vacuna que comprende proteínas neumocóccicas para la prevención de neumonía en personas de
20 la tercera edad.

En otra realización, el presente invento proporciona una composición de vacuna, apropiada para utilizar en bebés (típicamente 0 a 2 años), que comprende dos o más proteínas neumocóccicas identificadas en el presente invento.

Proteínas neumocóccicas del Invento

Las proteínas de streptococcus pneumoniae del invento son de superficie expuesta, al menos durante parte del ciclo de vida del neumococo, o son proteínas las cuales son
30 secretadas o liberadas por el neumococo. Preferiblemente la combinación de proteínas del invento son seleccionadas de dos categorías diferentes tales como proteínas con un motivo de

27

LXXC de secuencia de Señal Tipo II (donde X es cualquier aminoácido, ej., la familia de triada de polihistidina (phtX), proteínas de unión de colina (cbpX), proteínas con un motivo de secuencia de Señal Tipo I (ej., Sp101), proteínas con un motivo de LPXTG (donde X es cualquier aminoácido, ej., Sp128, Sp130), toxinas (ej., Ply), etc. ejemplos preferidos dentro de estas categorías (o motivos) son las siguientes proteínas, o equivalentes y morfológicamente funcionales de las mismas.

10 La composición inmunogénicas del presente invento comprende al menos dos proteínas seleccionadas del grupo que consta de la familia de triada de polihistidina (PhtX), la familia de proteínas de unión de colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, truncados LytX, proteínas quiméricas de truncado CbpX - truncado LytX (o fusiones), neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133. Sin embargo, si CbpX es PspC, entonces la segunda proteína no es PspA p PsaA. Preferiblemente, la composición inmunogénicas comprende dos o más proteínas seleccionadas del grupo que
15 consta de la familia de triada de polihistidina (PhtX), familia de proteínas de unión de colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, truncados LytX, proteínas quiméricas de truncado CbpX-truncadoLytX (o fusiones), pneumolisina (Ply), PspA, PsaA, y Sp128. Más preferiblemente, la composición
20 inmunogénica comprende dos o más proteínas seleccionadas del grupo que consta de la familia de triada de polihistidina (PhtX), la familia de proteínas de unión de colina (CbpX), truncados CbpX, familia LytX, truncados LytX, proteínas quiméricas de truncado CbpX - truncado LytX (o fusiones),
25 neumolisina (Ply), y Sp128.
30

La familia Pht. (tríada de polihistidinas) comprende las proteínas PhtA, PhtB, PhtD, y PhtE. La familia está

caracterizada por una secuencia de lipidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y varias tríadas de histidina, posiblemente involucrada en unión de metales o nucleósidos o actividad enzimática, (3-5) regiones coiled-coil (dobles alfa hélice), un N-terminal conservado y un C-terminal heterogéneo. Presente en todas las cepas de neumococos probados. También se han encontrado proteínas homólogas y otros *Streptococos* y *Neisseria*. Los miembros preferidos de la familia comprenden PhtA, PhtB y PhtD. Más preferiblemente, ésta comprende PhtA o PhtD. Se entiende, sin embargo, que los términos PhtA, B, D, y E se refieren a proteínas con secuencias divulgadas en las referencias más adelante así como también a variantes naturales (y artificiales) de las mismas que tienen una homología de secuencia que es al menos 90% idéntica a las proteínas citadas. Preferiblemente es al menos 95% idéntica y más preferiblemente es 97% idéntica.

Con respecto a las proteínas Pht, PhtA se divulga en WO 98/18930, y también se relaciona con Sp36. Como se anotó anteriormente, ésta es una proteína de la familia de triada de polihistidina y tiene el motivo de LXXC de Señal tipo II.

PhtD se divulga en WO 00/37105, y también está relacionada con Sp036D. Como se anotó anteriormente, ésta también es una proteína de la familia de triada de polihistidina y tiene el motivo de LXXC de Señal tipo II.

PhtB se divulga en WO 00/37105, y también está relacionada con Sp036B. Otro miembro de la familia PhtB es el polipéptido degradador de C3, como se divulga en WO 00/17370. Esta proteína también es de la familia de triada de polihistidina y tiene el motivo de LXXC de Señal tipo II. Un equivalente inmunológicamente funcional preferido es la proteína Sp42 divulgada en WO 98/18930. Un truncado de PhtB

(aproximadamente 79kD) es divulgado en WO99/15675 el cual también es considerado un miembro de la familia PhtX.

PhtE se divulga en WO00/30299 y es conocida como BVH-3.

Con respecto a la familia de proteínas de unión de colina, los miembros de esa familia fueron originalmente identificados como proteínas neumocóccicas que podían ser purificadas mediante cromatografía de afinidad por colina. Todas las proteínas de unión de colina no están covalentemente unidas a radicales de fosforilcolina de ácido teicóico de pared celular y ácido lipoteicoico asociado con membrana. Estructuralmente, éstas tienen varias regiones en común sobre toda la familia, aunque la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia aminoácida, longitud, etc.) puede variar. En general, las proteínas de unión de colina comprenden una región N terminal (N), regiones repetidas conservadas (R1 y/o R2), una región rica en prolina (P) y una región de unión de colina conservada (C), compuesta de múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente la mitad de la proteína. Como se utiliza en esta solicitud, el término "familia de proteína de unión de colina (Cbpx)" es seleccionado del grupo que consta de proteínas de unión de colina como se identifican en WO 97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, y CbpG. CbpA es divulgada en WO 97/41151. CbpD y CbpG son divulgadas en WO 00/29434. PspC es divulgada en WO 97/09994. PbcA es divulgada en WO 98/21337. PspA es una proteína de unión de colina divulgada en WO 98/39450. Preferiblemente las proteínas de unión de colina son seleccionadas del grupo que consta de CbpA PbcA, SpsA y PspC.

Otra realización preferida es truncados CbpX en donde "Cbpx" se define como antes y "truncados" se refiere a proteínas CbpX que carecen de 50% o más de la región de unión de colina (C). Preferiblemente tales proteínas carecen de

toda la región de unión de colina. Más preferiblemente, tales truncados proteicos carecen de (i) la región de unión de colina y (ii) una porción de la mitad N-terminal de la proteína también, sin embargo retienen al menos una región de repetición (R1 o R2). Más preferiblemente aún, el truncado tiene dos regiones de repetición (R1 y R2). Ejemplos de tales realizaciones preferidas son NR1xR2 y R1xR2 como se ilustra en WO99/51266 o WO99/51188, sin embargo, otras proteínas de unión de colina que carecen de una región de unión de colina similar también son contempladas dentro del alcance de este invento.

La familia LytX son proteínas asociadas con membrana y con lisis celular. El dominio N-terminal comprende dominio de unión de colina, sin embargo la familia LytX no tiene todas las características encontradas en la familia CbpA observada anteriormente y por lo tanto para el presente invento, la familia LytX es considerada distinta de la familia CbpX. En contraste con la familia CbpX, el dominio C-terminal contiene el dominio catalítico de la familia proteica LytX. La familia comprende LytA, B y C. Con respecto a la familia LytX, LytA es divulgada en Ronda, Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). LytB es divulgada en WO 98/18930, y también es conocida como Sp46. LytC también es divulgada en WO 98/18930, y también es conocida como Sp91. Un miembro preferido de esa familia es LytC.

Otra realización preferida son los truncados LyTX en donde "LytX" es como se definió anteriormente y "truncados" se refiere a proteínas LytX que carecen de 50% o más de la región de unión de colina. Preferiblemente tales proteínas carecen de toda región de unión de colina. Un ejemplo de tales truncados puede ser encontrado en la sección de ejemplos de este invento.

Aún otra realización preferida de este invento son las proteínas quiméricas de truncado CbpX - truncado LytX (o fusiones). Preferiblemente esta comprende NR1xR2 (o R1xR2) de CpbX y la porción C-terminal (C-termino, es decir, que carece de dominios de unión de colina) de LytX (ej., LytCCterm o Sp91Cterm). Más preferiblemente CbpX es seleccionada del grupo que consta de CbpA, PbcA, y PspC. Más preferiblemente aún, es CbpA. Preferiblemente, LytX es LytC (también conocida como Sp91).

10 Otra realización del presente invento es una PsaA o truncados de PsaA que carece del dominio de unión de colina (C) y es expresada como una proteína de fusión con LytX. Preferiblemente, LytX es LytC.

La neumolisina es una toxina multifuncional con
15 distintas actividades de activación de complemento (Rubins. Respi. Cit Care Med, 153:1339-1346 (1996)). La toxina no es secretada por neumococos, pero es liberada ante lisis de neumococos bajo la influencia de autolisina. Sus efectos incluyen ej., la estimulación de la producción de citoquinas
20 inflamatorias por monocitos humanos, la inhibición del movimiento ciliar sobre epitelio respiratorio humano, y la disminución de actividad bactericida y migración de neutrófilos. El efecto más obvio de neumolisina está en la lisis de glóbulos rojos, la cual involucra la unión a
25 colesterol. Puesto que es una toxina, necesita ser detoxificada (es decir, no toxica para un humano cuando se proporciona en un dosificación apropiada para protección) antes del ser administrada *in vivo*. La expresión y clonación de neumolisina nativa o silvestre es conocida en el estado de
30 la técnica. Ver, por ejemplo, Walker (Infecto Immun, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell. (Biochim Biophys Acta, 1007:67-72 (1989) y Mitchell (NAR, 18:4010 (1990)). La detoxificación

del gen ply puede ser realizada por medios químicos, ej., sometida a formalina o tratamiento de glutaraldehído o una combinación de ambos. Tales métodos son bien conocidos en el estado de la técnica para varias toxinas. Alternativamente, ply puede ser genéticamente destoxificada. Así, el invento incluye derivados de proteínas neumocócicas las cuales pueden ser, por ejemplo, proteínas mutadas. El término "mutado" es utilizado aquí para referirse a una molécula que ha sido sometida a delección, adición o substitución de uno o más aminoácidos utilizando técnicas bien conocidas para mutagénesis dirigida a sitio o cualquier otro método convencional. Por ejemplo, como se describió anteriormente, una proteína de ply mutante puede ser alterada para que sea biológicamente inactiva mientras mantiene aún sus epítomos inmunogénicos, ver, por ejemplo, WO90/06951, Berry (Infect Immun, 67:981 (1999)) y WO99/03884.

Como se utiliza en la presente, se entiende que el termino "Ply" se refiere a neumolisina mutada o destoxificada apropiada para uso medico (es decir, no tóxica).

Con respecto a PsaA y PspA, ambas son conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, PsaA y variantes de delección de transmembrana de la misma han sido descritas por Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dic, 64(12):5255-62. PspA y variantes de delección de transmembrana de la misma han sido divulgadas en, por ejemplo, US 5804193, WO 92/14488, y WO 99/53940.

Sp128 y Sp130 son divulgadas en WO00/76540.

Sp125 es un ejemplo de una proteína de superficie de pneumococo dentro del motivo de LPXTG de anclaje de pared celular (en donde X es cualquier aminoácido). Cualquier proteína dentro de esta clase de proteína de superficie de pneumococo con este motivo ha sido encontrada como útil

dentro del contexto del invento, y por lo tanto es considerada una proteína adicional del invento. Sp125 misma es divulgada en WO 98/18930, y también es conocida como ZmpB - una metaloproteinasa de zinc.

5 Sp101 es divulgada en WO 98/06734 (donde ésta tiene la referencia # y85993. Se caracteriza por una secuencia de señales de Tipo I.

Sp133 es divulgada en WO 98/06734 (donde tiene una referencia # y85992. También se caracteriza por una secuencia
10 de señales Tipo I.

Las proteínas del invento también pueden ser benéficamente combinadas. Combinaciones preferidas incluyen, pero no están limitadas a proteínas quiméricas o de fusión de PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91Cterm, proteínas quiméricas
15 o de fusión de PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA.

20 Preferiblemente, NR1xR2 (o R1xR2) es de CbpA o PspC. Más preferiblemente es de CbpA.

Una combinación particularmente preferida de proteínas de pneumococo comprende Ply (o un truncado o equivalente inmunológicamente funcional de la misma) + PhtD (o un
25 truncado o equivalente inmunológicamente funcional de la misma) + NR1xR2 (o R1xR2). Preferiblemente, NR1xR2 (o R1xR2) es de CbpA o PspC. Más preferiblemente es de CbpA.

El presente invento también incluye "equivalentes inmunológicamente funcionales" a las proteínas del invento.
30 "Equivalente inmunológicamente funcional" es definido como un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo protector de las proteínas del invento. Tales epítipos

característicamente son de superficie expuesta, altamente conservados, y pueden producir una respuesta de anticuerpos bactericidas en un hospedero o prevenir efectos tóxicos.

Preferiblemente, el equivalente funcional tiene al menos 15 y
5 preferiblemente 30 o más aminoácidos contiguos de la proteína del invento y pueden ser utilizados con la condición que sean capaces de elevar substancialmente la misma respuesta inmune que la proteína nativa. La posición de los epítopos de

10 células-B potenciales en una secuencia proteica puede ser fácilmente determinada mediante la identificación de péptidos que son tanto de superficie expuesta como antigénicos utilizando una combinación de dos métodos: predicción de estructuras-2D y predicción de índice antigénico. La

predicción de estructuras 2D puede ser hecha utilizando un
15 programa PSIPRED (de David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. de Ciencias Biológicas, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK). El índice antigénico puede ser calculado sobre la base del método descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]).

20 El presente invento tiene ventajas sobre vacunas de polisacáridos de *S. pneumoniae* en que múltiples composiciones (inmunogénicas) proteicas de *S. pneumoniae* pueden incluir mayor protección cruzada a través de los numerosos serotipos, pueden además inhibir adherencia y formación de colonias, y
25 pueden potencialmente elevar anticuerpos que pueden neutralizar funciones tóxicas/enzimáticas de un patógeno. Además, antígenos de superficie adicionales proporcionan un medio para estimular adicionalmente la opsonofagocitosis.

El presente invento también contempla vacunas de
30 combinación las cuales proporcionan protección contra un rango de diferentes patógenos. Muchas vacunas pediátricas ahora son administradas como una vacuna de combinación para

reducir el número de inyecciones que el niño tiene que recibir. Así para vacunas pediátricas otros antígenos de otros patógenos pueden ser formulados con las vacunas del invento. Por ejemplo las vacunas del invento pueden ser

5 formuladas con (o administradas separadamente pero al mismo tiempo) la conocida vacuna de combinación "trivalente" que comprende el toxoide de la difteria (DT), toxoide de tétano (TT), y componentes de tos ferina [típicamente toxoide de tos ferina destoxificado (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA)

10 con pertactina opcional (PRN) y/o aglutinina 1+2], por ejemplo la vacuna comercializada INFANRIX-DTPa (SmithKlineBeecham Biologicals) la cual contiene antígenos de DT, TT, PT, FHA y PRN, o con un componente completo de tos ferina celular por ejemplo el comercializada por

15 SmithKlineBeecham Biologicals s.a., como Tritanrix. La vacuna combinada también puede comprender otro antígeno, tal como el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), antígenos de poliovirus (por ejemplo poliovirus trivalente inactivo - IPV), proteínas de membrana exterior de *Moraxella*

20 *catarrhalis*, proteínas de membrana exterior, proteínas de *Haemophilus influenzae* no tipificables, proteínas de membrana exterior de *N.meningitidis* B.

Ejemplos de antígenos proteicos de *Moraxella catarrhalis* preferidos los cuales pueden ser incluidos en una vacuna de

25 combinación (especialmente para prevención de otitis media) son: OMP106 [WOM97/41731 (Antex) & WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA &/o LbpB [WO 98/55606 (PMC)]; TbpA &/o TbpB [WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, (1993) Infect, Immun. 61:2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [WO 93/03761

30 (Universidad de Texas)]; OmpCD; HsaR (PCT/EP99/03824); PilQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); lipo06 (GB 99179772.2); lipo10 (GB 9918208.1); lipo11 (GB 9918302.2);

lipo 18 (GB 9918038.2); p6 (PCT/EP99/03038); D15

(PCT/EP99/03822); Omp1A1 (PCT/EP99/06781); Hly3

(PCT/EP99/03257); y OmpE. Ejemplos de antígenos de

Haemophilus influenzae no tipificables los cuales pueden ser

5 incluidos en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de otitis media) incluyen: proteína de Fimbrin

[(US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] y fusiones

que comprenden péptidos de la misma [ej fusiones de péptidos

LB1(f); US 5843464 (OSU) o WO 99/64067]; OMP26 [WO 97/01638

10 (Cortecs)]; P6 [EP 281673 (State University of New York)];

TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4;

Hap; D15 (WO 94/12641); proteína D (EP 594610); P2; y P5 (WO

94/26304).

En otra realización, varios antígenos citados

15 anteriormente pueden ser incluidos en la composición

inmunogénica del invento como antígenos presentes sobre la

superficie de vesículas (ampollas) de membrana exterior

hechas de las bacterias de las cuales ésta es derivada.

Otras combinaciones contempladas son las proteínas de *S.*

20 *pneumoniae* del invento en combinación con antígenos virales,

por ejemplo, de influenza (atenuados, divididos, o subunidad

[ej., glicoproteínas de superficie neuraminidasa (NA) y

hemaglutinina (HA). Ver, ej., Chaloupka I, Eur. Journal

Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15:121-127], RSV (ej.,

25 antígenos F y G o fusiones F/G, ver, ej, Schmidt A. C., J

Virol, May 2001, p4594 - 4603), PIV3 (ej, proteínas HN y F,

ver Schmidt supra), Varicella (ej., glicoproteínas atenuadas

I-V, etc), y cualquier (o todos) componente (s) de MMR

(sarampión, paperas, rubéola).

30

Antígenos Polisacáridos del Invento

La presente solicitud también contempla la combinación

de vacunas con dos o más proteínas de *S. pneumoniae* combinadas con polisacáridos diferentes de *S. pneumoniae*. Tales polisacáridos pueden ser aislados de, por ejemplo, *H. influenzae*, *H. influenzae* tipo B (Hib), *N. meningitidis*

5 grupos A, C, W, Y, *Streptococos* diferentes de *S. pneumoniae* (ej., *Streptococo* Grupo B, *S. pyogenes*, etc), *Estafilococos* (ej., *S. aureus*, *S. epidermidis*), *E. coli*, *Enterococos* (ej., *E. faecalis* y *E. faecium*), etc. preferiblemente los polisacáridos son de *H. influenzae* tipo B (hib), y/o *N. meningitidis* grupos A, C, W135, y/o Y.

Como se mencionó anteriormente, un problema asociado con el enfoque de polisacáridos para vacunación, es el hecho que los polisacáridos *per se* son inmunógenos deficientes. Para superar esto, los polisacáridos pueden ser conjugados con
15 vehículos proteicos, los cuales proporcionan ayuda de células-T circundantes. Se prefiere por lo tanto, que los polisacáridos utilizados en el invento estén ligados a tal vehículo proteico. Ejemplos de tales vehículos los cuales son actualmente comúnmente utilizados para la producción de
20 inmunógenos de polisacáridos incluyen los toxoides de Difteria y Tetanos (DT, DT CRM197, otros mutantes de DT, ej., posición Glu-148, etc. [ver, ej., US 4.709.017, WO93/25210, WO95/33481, etc.] y TT (y fragmento C de TT), respectivamente), Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), OMPC de
25 *N. meningitidis*, y el derivado proteico purificado de Tuberculina (PPD).

Otro vehículo para composiciones inmunogénicas (o vacunas) basadas en polisacáridos es la proteína D de *Haemophilus influenzae* (EP 594610-B), o fragmentos de la
30 misma. Los fragmentos apropiados para utilizar incluyen fragmentos que abarcan epítopos T-auxiliares. En particular un fragmento de proteína D preferiblemente contendrá el 1/3

N-terminal de la proteína.

El polisacárido puede estar unido a la proteína portadora mediante cualquier método (por ejemplo, Likhite, Patente U.S. 4.372.945 y por Armor, Patente U.S. No.

5 4.474.757). Preferiblemente, se realiza conjugación CDAP (WO 95/08348). Para mejorar la inmunogenicidad, los polisacáridos pueden ser (dimensionados (despolimerizados), coadyuvados, liofilizados, o conjugados con proteínas portadoras diferentes.

10

Coadyuvantes TH1 del Invento

Las vacunas del presente invento preferiblemente son coadyuvadas. Coadyuvantes apropiados incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alum) o
15 fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, magnesio, hierro o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos catiónica o aniónicamente derivados, o polifosfacenos.

20

Se prefiere que el coadyuvante sea seleccionado como un inductor preferencial de un tipo TH1 de respuesta. Estos niveles altos de citoquinas tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunes mediadas por células a un antígeno dado, mientras altos niveles de citoquinas tipo Th2
25 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales al antígeno.

30

Es importante recordar que la distinción de respuesta inmune tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad un individuo dará soporte a una respuesta inmune la cual es
30 descrita como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citoquinas en términos de lo descrito en clones de células

T CD4 +ve murinas por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) células TH1 y TH2: diferentes patrones de secreción de linfoquinas lleva a diferentes propiedades funcionales. *Reseña Anual de Inmunología*, 7 p145-173).

- 5 Tradicionalmente, las respuestas tipo Th1 están asociadas con la producción de las citoquinas INF- γ y IL-2 por T-linfocitos. Otras citoquinas a menudo directamente asociadas con la inducción de respuestas inmunes tipo Th1 no son producidas por las células-T, tales como IL-12. En contraste,
- 10 las respuestas tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Sistemas coadyuvantes apropiados que promueven una respuesta predominantemente Th1 incluyen:·
- 15 lípido A de monofosforilo o un derivado del mismo, particularmente lípido A de monofosforilo 3-de-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación ver GB 2220211 A); y una combinación de lípido A de monofosforilo, preferiblemente lípido A de monofosforilo 3-de-O-acilado, junto con
- 20 cualquiera sal de aluminio (por ejemplo fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o una emulsión de aceite en agua. En tales combinaciones, antígeno y 3D-MPL son contenidos en las mismas estructuras particuladas, permitiendo liberación más eficiente de señales antigénicas e inmunoestimulantes. Estudios han mostrado que 3D-MPL puede aumentar
- 25 adicionalmente la inmunogenicidad de un antígeno alum-absorbido [Thoelen Vaccine (1998) 16:108-14; EP 689454-B1].

Un sistema aumentado involucra la combinación de un lípido A de monofosforilo y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se divulga en WO 94/00153, o una composición menos reactogénica

30 donde el QS21 es apagado con colesterol como se divulga en WO 96/33739.

Una formulación coadyuvante particularmente potente que

involucra Qs21, 3D-MPL y tocoferol en un aceite en emulsión de agua es descrita en WO 95/17210, y es una formulación preferida.

Preferiblemente la vacuna adicionalmente comprende una saponina, más preferiblemente QS21. La formulación también puede comprender un aceite en emulsión de agua y tocoferol (WO 95/17210).

El presente invento también proporciona un método para producir una formulación de vacuna que comprende la mezcla de una proteína del presente invento junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como 3D-MPL.

Oligonucleótidos no metilados que contienen CpG (WO 96/02555) son también inductores preferenciales de una respuesta TH1 y son apropiados para utilizar en el presente invento.

En un aspecto adicional del presente invento se proporciona una vacuna como se describió en la presente para utilizar en medicina. En una realización se presenta un método para prevenir o aliviar neumonía en un humano de la tercera edad que comprende la administración de una cantidad segura y efectiva de una vacuna del invento, y opcionalmente un coadyuvante Th1, a dicho paciente de la tercera edad.

En una realización adicional se proporciona un método para prevenir o aliviar otitis media en bebés (hasta 24 meses) o niños de corta edad (típicamente 24 meses a cinco años), que comprende la administración de una cantidad segura y efectiva de una vacuna que comprende proteína de *streptococcus pneumoniae* del presente invento y opcionalmente un coadyuvante Th1, a dicho bebé o niño de corta edad.

Preparaciones de vacunas del invento

Las preparaciones de vacunas del presente invento pueden

ser utilizadas para proteger o tratar un mamífero susceptible a infección, mediante la administración de dicha vacuna a través de ruta sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de rutas intramusculares, intraperitoneales, intradérmicas o subcutáneas; o a través de administración mucosa hacia los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. La administración intranasal de vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media es preferida (puesto que el transporte nasofaríngeo de neumococos puede ser más efectivamente prevenido, atenuando así la infección en su estado más temprano). Aunque la vacuna del invento puede ser administrada como una única dosis, los componentes de la misma también pueden ser co-administrados al mismo tiempo o en diferentes momentos (por ejemplo si los polisacáridos están presentes en una vacuna estos podrían ser administrados separadamente al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de la combinación proteica bacteriana de la vacuna para óptima coordinación de las respuestas inmunes entre sí). Además de una ruta simple de administración, se pueden utilizar dos rutas diferentes de administración. Por ejemplo, antígenos virales pueden ser administrados de manera intradérmica (ID), mientras las proteínas bacterianas pueden ser administradas de manera intramuscular (IM) o intranasal (IN). Si los polisacáridos están presentes, estos pueden ser administrados IM (o ID) y las proteínas bacterianas pueden ser administradas IN (o ID). Además, las vacunas del invento pueden ser administradas IM para dosis iniciales e IN para dosis de refuerzo.

La cantidad de antígeno conjugado en cada dosis de vacuna es seleccionada como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos secundarios significativos en vacunas típicas. Tal cantidad variará

42

dependiendo del inmunógeno específico empleado y la forma en que es presentado. El contenido de antígenos proteicos en la vacuna típicamente estará en el rango entre 1-100 ug, preferiblemente 5-50 ug, más típicamente en el rango 5-25 ug.

- 5 Si los polisacáridos están incluidos, generalmente se espera que cada dosis comprenda entre 0.1-100 ug de polisacárido, preferiblemente 0.1-50 ug, preferiblemente 0.1-10 ug, de los cuales 1 a 5 ug es el rango más preferible.

- 10 Las cantidades óptimas de componentes para una vacuna particular pueden ser investigadas mediante estudios estándares que involucren observación de respuestas inmunes apropiadas en sujetos. Siguiendo una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente separadas.

- 15 La preparación de vacunas generalmente es descrita en diseño de vacunas ("el enfoque de subunidad y coadyuvante) (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). La encapsulación dentro de liposomas es descrita por Fullerton, Patente U.S. 4.235.877.

- 20 Aunque las vacunas del presente invento pueden ser administradas mediante cualquier ruta, la administración de las vacunas descritas en la piel (ID) forma una realización del presente invento. La piel humana comprende una cutícula "callosa" exterior, llamada estrato córneo, el cual cubre la epidermis. Bajo esta epidermis se encuentra una capa llamada
25 la dermis, la cual a su vez cubre el tejido subcutáneo. Los investigadores han mostrado que la inyección de una vacuna en la piel, y particularmente en la dermis, estimula una respuesta inmune, la cual también puede estar asociada con un
30 número de ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en la presente forma una característica preferida del presente invento.

La técnica convencional de inyección intradérmica, el "procedimiento mantoux", comprende los pasos de limpiar la piel, y luego estirar con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre pequeño (calibre 26-31) hacia arriba la
5 aguja es insertada en un ángulo entre 10-15 grados. Una vez el bisel de la aguja es insertado, el cuerpo de la aguja es bajado y empujado adicionalmente mientras se proporciona una presión leve para elevarlo bajo la piel. El líquido es luego inyectado muy lentamente formando así una ampolla o
10 protuberancia sobre la superficie de la piel, seguido por el retiro lento de la aguja.

Más recientemente, se han descrito dispositivos que son específicamente diseñados para administrar agentes líquidos en o a través de la piel, por ejemplo los dispositivos
15 descritos en WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección a chorro descritos por ejemplo en WO 01/13977; US 5.480.381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5.339,163, US
20 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596, 556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 Y WO 97/13537. Métodos alternativos de administración intradérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o
25 dispositivos diseñados para liberación balística de vacunas sólidas (WO 99/27961), o parches transdérmicos (WO 97/48440; WO 98/28037); o aplicadas a la superficie de la piel (liberación transdérmica o transcutánea WO 98/20734; WO 98/28037).

30 Cuando las vacunas del presente invento van a ser administradas a la piel, o más específicamente en la dermis, la vacuna está en un volumen líquido bajo, particularmente un

volumen entre 0.05 ml y 0.2 ml.

El contenido de antígenos en la piel o vacunas transdérmicas del presente invento puede ser similar a las dosis convencionales como se encontró en vacunas intramusculares. Sin embargo, es una característica de vacunas de piel o intradérmicas que las formulaciones pueden estar en "dosis bajas". Por consiguiente los antígenos proteicos presentes en vacunas intradérmicas pueden estar en el rango entre 1-100 ug, preferiblemente 5-50ug. Igualmente, si está presente, la cantidad de antígeno conjugado polisacárido en cada dosis de vacuna generalmente se espera comprenda 0.1-100 ug de polisacárido, preferiblemente 0.1-50 ug, preferiblemente 0.1-10 ug, y puede estar entre 1 y 5 ug. Sin embargo, ésta es una característica de piel o vacunas intradérmicas que las formulaciones pueden ser "dosis bajas". Por consiguiente los antígenos proteicos en vacunas de "dosis bajas" están preferiblemente presentes en tan poco como 0.1 y 10 ug, preferiblemente 0.1 y 5 ug por dosis; y si están presentes los antígenos conjugados polisacáridos pueden estar presentes en el rango entre 0.01 y 1 ug, y preferiblemente entre 0.01 y 0.5 ug del polisacárido por dosis.

Como se utiliza en la presente, el término "liberación intradérmica" significa liberación de la vacuna a la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna necesariamente no estará localizada exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa en la piel localizada entre 1.0 y 2.0 mm desde la superficie en la piel humana, pero existe una cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar alcanzar la dermis a 1.5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis está localizada entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y por debajo de la capa

45

subcutánea. Dependiendo del modo de liberación, la vacuna puede generalmente ser localizada única o principalmente dentro de la dermis, o puede finalmente ser distribuida dentro de la epidermis y la dermis.

5 En otro aspecto del invento, el presente invento puede contener ADN que codifica una o más proteínas de *S. pneumoniae*, tal que la proteína es generada *in situ*. El ADN puede estar presente dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de entrega conocidos por aquellos con experiencia
10 común en el estado de la técnica, incluyendo sistemas de expresión de ácidos nucleicos, sistemas de expresión viral y bacteriana. Numerosas técnicas de entrega genética son bien conocidas en el estado de la técnica, tales como aquellas descritas por Rolland, *ICrit. Rev. Therap. Sistemas*
15 *Portadores de Fármacos* 15:143-198, 1998) y referencias citadas en los mismos. Los sistemas apropiados de expresión de ácidos nucleicos contienen las secuencias de ADN necesarias para expresión en el paciente (tal como un promotor y señal de terminación apropiados). Cuando el
20 sistema de expresión es un microorganismo vivo recombinante, tal como un virus o bacteria, el gen de interés puede ser insertado en el genoma de una bacteria o virus recombinante vivo. La inoculación e infección *in vivo* con este vector vivo lleva a expresión *in vivo* del antígeno e inducción de
25 respuestas inmunes. Los virus y bacterias utilizados para este propósito son por ejemplo: virus pox (ej., *vaccinia* (viruela), *pustulación avícola*, *virus canarypox*), *alfavirus*, *virus Sindbis*, *virus Semliki Forest*, *Virus de Encefalitis Equina Venezolana*), *adenovirus*, *virus adeno-asociados*,
30 *picornavirus* (*poliovirus*, *rinovirus*), *herpesvirus* (*virus de viruela de pollo*, etc), *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Neisseria*, BCG. Estos virus y bacterias pueden ser

virulentos, o atenuados en varias formas con el objeto de obtener vacunas vivas. Tales vacunas vivas también forman parte del invento.

En un aspecto adicional del presente invento se
5 proporciona un método de fabricación de una formulación de vacuna como se describió en la presente, en donde el método comprende el mezclado de una combinación de proteínas según el invento.

Preferiblemente las composiciones antigénicas (y
10 vacunas) que contienen polisacáridos descritas anteriormente son liofilizadas hasta que están a punto de ser utilizadas, punto en el cual son extemporáneamente reconstituidas con diluyente. Más preferiblemente son liofilizadas en presencia de 3D-MPL, y son extemporáneamente reconstituidas con
15 solución salina.

La liofilización de vacunas es bien conocida en el estado de la técnica. Típicamente la vacuna líquida es secada por congelamiento en presencia de un agente anti-pelmazante por ejemplo azúcares tales como sacarosa o lactosa (presentes
20 en una concentración inicial de 10-200 mg/mL). La liofilización ocurre típicamente sobre una serie de pasos, por ejemplo un ciclo que comienza en -69°C, gradualmente se ajusta a -24°C durante 3 horas, luego retiene esa temperatura durante 18 horas, luego gradualmente se ajusta a -16 °C
25 durante 1 hora, luego retiene esta temperatura durante seis horas, luego gradualmente se ajusta a +34 °C durante 3 horas, y finalmente retiene esta temperatura durante 9 horas.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas del invento puede ser evaluadas en varios modelos animales o con sueros
30 humanos. Como una ilustración, los siguientes modelos animales pueden ser utilizados para evaluar la infección por pneumococo. Ratones C3H/HeJ (6 a 8 semanas de edad) pueden

ser inmunizados s.c. con 15 ug de proteína complementada con 50 ul de CFA, seguido 3-4 semanas después por refuerzo con 15 ug de proteína con IFA. Para demostrar protección pasiva y activa contra infección sistémica, a los ratones se les puede
5 administrar de manera intraperitoneal sueros inmunes o proteínas antes de presentación mediante inyección intraperitoneal con 15 a 90 neumococos LD50 en la semana 8-10. Adicionalmente, las proteínas puede ser probadas en un modelo de colonización nasofaríngea de ratón mediante (Wu
10 patogénesis microbiana 1997; 23: 127-137).

Además de ratones, ratones bebés son susceptibles a colonización e infección por *S. pneumoniae*. En estudios protectores pasivos, la administración de sueros inmunes de ratón (100 ul i.p. o 10 ul i.n.) puede ser realizada antes de
15 presentación con administración intranasal de *S. pneumonia* (10 ul) en ratones de 2-5 días de edad. La colonización puede ser determinada al sembrar lavados nasales (20-40 ul instilados, 10 ul retirados).

Inyecciones favorables entre los componentes proteicos de la vacuna de combinación pueden ser demostradas mediante
20 administración de una dosis de cada proteína en la vacuna la cual sería sub-protectora en una vacuna monovalente. La eficacia protectora aumentada de la vacuna de combinación comparada con vacunas monovalentes puede ser atribuida a una
25 interacción favorable entre los componentes.

El invento es ilustrado en los ejemplos anexos. Los ejemplos son llevados a cabo utilizando técnicas estándares, las cuales son bien conocidas y comunes para aquellos con experiencia en el estado la técnica, excepto donde se
30 describa lo contrario en detalle. Los ejemplos tienen el propósito de ilustrar, pero no limitar el invento.

EJEMPLOS**Ejemplo 1. Construcción y Expresión de Antígenos****NR1xR2**

5 CbpA es una proteína de superficie expuesta de 75 kDa que consta de varios dominios. El dominio N-terminal comprende 2 repeticiones altamente conservadas (R1 y R2) y el dominio C-terminal comprende 10 repeticiones tandem, secuencias repetitivas directas de 20 aminoácidos. Un
10 truncado CbpA fue preparado para producir NR1XR2, es decir, sin el dominio de unión de colina.

 El gen NR1XR2 fue amplificado, vía PCR, a partir de ADN obtenido de una cepa serotipo 4 de *S. pneumoniae* (ver, ej., WO97/41157, o WO99/51266). PCR fue realizado con el sistema
15 PCR HiFi (Roche). Este está compuesto de una mezcla que contiene polimerasa Taq y una polimerasa de corrección. Debido a la actividad de corrección de exonucleasa 3'-5' inherente, el uso de Hi-Fi resulta en una fidelidad aumentada triple de síntesis de ADN en comparación con polimerasa Taq.

20 Los fragmentos PCR fueron clonados en el vector pGEM-T a partir de Sistemas de vector pGEM-T (Promega). Éste paso fue necesario para facilitar la digestión enzimática de restricción del fragmento PCR para futuras ligaciones. El vector pGEM-T es proporcionado lineal y contiene colgantes
25 3'-T. Estos colgantes facilitan la inserción de productos PCR generados mediante polimerasas termoestables que agregan una deoxiadenosina simple, en una forma independiente de hebra, a los extremos 3' del fragmento amplificado.

 Los fragmentos y vectores fueron purificados después de
30 digestiones enzimáticas (digestiones *NdeI* y *XbaI*) según el artículo de Benore-Parsons (Nucleic Acids Research, 23, 4926-4927, 1995). El corte de agarosa fue liofilizado

completamente durante 3-4 horas. Una solución de etanol-TE 1:1 fue agregada al gel liofilizado. La muestra fue mezclada suavemente durante 1h, la agarosa fue comprimida y completamente removida mediante centrifugación. El ADN fue recuperado del eluyente mediante precipitación de etanol.

El ADN que codifica NR1xR2 fue clonado en un vector que contiene promotor largo L a partir de fago λ . La proteína de interés podría ser termo inducida cuando está presente en la cepa AR 58 E. coli, o mediante ácido nalidixico en la cepa AR 120 de *E.coli*.

Un precultivo de bacterias fue hecho durante la noche a 30°C. Este precultivo fue diluido aproximadamente 40 veces en un volumen total de 20 ml y colocado a 30°C hasta un O.D. de 0.4-0.6. Luego, la inducción térmica fue hecha a 42°C. Las muestras fueron tomadas en puntos de tiempo diferentes. 1 ml de cultivo fue centrifugado 5 minutos a 7000 rpm. El sobrenadante de cultivo fue conservado a -20°C y el pellet (extracto total) fue resuspendido en 500 ul de amortiguador de muestra (western blot o análisis SDS-PAGE), o en 500 ul de amortiguador de lisis e incubado 30 minutos a 37°C (ELISA). La composición de amortiguador de lisis es SDS al 0.1%, Deoxicolato al 0.1%, Na citrato: 0.015 M.

Las muestras fueron corridas sobre un SDS-PAGE, cargadas sobre gel al 4-20% (Novex, Invitrogen). Se realizó migración a 200 V. Se realizó tñido con azul Coomassie. Las muestras fueron cargadas sobre gel al 4-20% (Novex, Invitrogen) para Western Blotting. La migración fue hecha a 200 V. El gel fue transferido sobre nitrocelulosa y se revelaron puntos con anticuerpos policlonales alfa-NR1xR2 de conejo (primer anticuerpo) y un anticuerpo de alfa-conejo acoplado con fosfatasa alcalina (segundo anticuerpo).

Una banda de aproximadamente 55kDa fue observada

SP

mediante análisis SDS-PAGE. Un clon, 28B2, fue elegido sobre la base del análisis SDS-PAGE y transferido a fermentación. Este clon fue secuenciado y su secuencia fue confirmada (39 aminoácidos (es decir, después de secuencia de señales) a 446 = 406 aminoácidos).

La solubilidad de NR1xR2 también fue estudiada, después de lisis de bacterias inducidas durante toda la noche seguido por centrifugación. Un análisis SDS-PAGE y una prueba ELISA fueron realizadas. NR1xR2 pareció principalmente ser recuperado (>95%) en la fracción soluble.

R1xR2, *PhtD*, *Sp91*, *(N)R1xR2-Sp91[dominio C-terminal]*, y *Ply*
Estos genes también fueron clonados, secuenciados y expresados en una forma similar a NR1xR2. R1xR2 contiene los aminoácidos 177 a 443 de CbpA (de *S. pneumoniae* serotipo 4N), PhtD contiene los aminoácidos 21 (es decir, después de secuencia de señales) hasta el final (aminoácido 839 de *S. pneumoniae* serotipo 4N), Sp91 comienza en el aminoácido 20 (VAA) hasta el final. Para las proteínas de fusión, R1xR2-Sp91Cterm contiene los aminoácidos 177-446 de CbpA y los aminoácidos 271 hasta el codón de terminación de traducción; NR1xR2-Sp91Cterm contiene los aminoácidos 39-446 de CbpA y los aminoácidos 271 hasta el codón de terminación de traducción. Para ambas proteínas de fusión, 2 aminoácidos adicionales (GS) son encontrados entre las secuencias (N)R1xR2 y Sp91Cterm. Para todas las construcciones, un ATG ha sido introducido 5' del comienzo del gen para permitir transcripción y traducción, lo cual significa que hay una metionina N-terminal adicional en frente de cada secuencia mencionada anteriormente.

Ejemplo 2. Serología

Utilizando sueros de estudios clínicos, se midieron las ELISAs para las respuestas de anticuerpos que se desarrollaron de manera natural a proteínas de *S.pneumoniae*.

5

2.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

* Muestras séricas

- Sueros emparejados de bebés recolectados de 2 a 4 meses de edad y 6 a 12 meses de edad, respectivamente (N=20, estudios DTPa HBV).
- Sueros de adultos de aproximadamente 20 años de edad (N=50).
- Sueros de adultos ≥ 65 años de edad (N=140).

15

* Procedimientos ELISA

Inmuno-placas fueron recubiertas durante la noche a 4°C con 1 ug/ml de cada proteína. Diluciones seriales dobles de sueros (comenzando en una dilución de 1/10th) fueron luego incubadas durante una hora a temperatura ambiente bajo agitamiento. La inmuno detección fue realizada utilizando un anticuerpo monoclonal de IgG anti-humano acoplado con peroxidasa (Strateck, HP6043) diluido 4000 veces e incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente bajo agitación. Después de revelado, se calcularon los títulos de punto intermedio mediante Soft6MaxPro. Los sueros con títulos $\geq$ fueron considerados como positivos. Para el calculo medio geométrico, un titulo de 5 fue arbitrariamente atribuido a sueros negativos.

30

Las concentraciones de IgG expresadas como ug/ml fueron establecidas comparando las densidades ópticas de muestras (OD) a la curva OD de IgG (Jackson) atrapado sobre la placa mediante anticuerpos IgG de cabra anti-humano policlonales y divulgados por el mismo anticuerpo rotulado con peroxidasa anterior.

2.2 RESULTADOS

2.2.1 serología de proteínas estreptocóccicas en bebés

Los títulos de anticuerpos más altos y las tasas de seropositividad medidas en sueros de bebés de 2 a 4 meses de edad fueron obtenidas con PhtD, PsaA, Sp128, NR1xR2 y en una extensión menor, con Sp91 y Ply. Respuestas bajas o nulas a Sp101 y Sp130 fueron detectadas. Sp46 y PhtA no fueron probados (cuestión de disponibilidad de material).

Las respuestas de anticuerpos generalmente disminuyeron en sueros de los mismos sujetos recolectados cuando éstos tuvieron entre 6 y 12 meses de edad, indicando que los títulos altos principalmente se debieron a anticuerpos maternos pasivamente transferidos.

Sin embargo, en ciertos bebés, la respuesta inmune a algunas proteínas aumentó con la edad, probablemente como una consecuencia de exposición natural a neumococos. El antígeno principalmente afectado por esta seroconversión fue claramente PsaA. Dependiendo del sujeto también se mostró el aumento de niveles de anticuerpos a PhtD, NR1xR2, Sp128, Sp91 y Ply. Solamente la variación marginal en la respuesta humoral a Sp101 y Sp130 fue observada. (ver figuras 1 y 2)

2.2.2 Serología de proteínas estreptocóccicas en adultos jóvenes

Según los títulos geométricos medios, PhtD, PhtA y NR1xR2 son la mayoría de proteínas inmunogénicas en la población adulta joven evaluada, seguidas luego por Sp128, Ply y Sp91. Todos los sujetos tuvieron anticuerpos detectables a estas proteínas. Las respuestas más bajas fueron medidas a Sp46, y especialmente a Sp130 y Sp101. SsaA no fue probada (no hubo suficiente suero disponible). (Ver figuras 3 y 4)

2.2.3 serología de proteínas estreptocóccicas en adultos de la tercera edad

Hubo una clara disminución en niveles de anticuerpos a proteínas estreptocóccicas en humanos de la tercera edad en comparación con adultos jóvenes. En la tercera edad, el mejor inmunógeno es PhtD, seguido por Sp128, NR1xR2, Sp91, Ply y PsaA. Solamente respuestas marginales fueron medidas a Sp101 y Sp130. Sp46 y PthA no fueron probados (cuestión de disponibilidad de material). (ver, figuras 5 y 6)

Tabla 1, Concentraciones medias geométricas de IgG (GMC), expresadas como ug/ml, en personas de la tercera edad

Proteína	IgG (GMC, µg/ml)
PDT	19
NR1xR2	3.5
Sp91	2.5
Ply	2.3

Todas las publicaciones, incluyendo pero sin limitar a patentes y solicitudes de patentes, citadas en ésta

especificación son incorporadas en la presente como
referencia como si cada publicación individual fuera
específicamente o individualmente indicada como incorporada
como referencia en la presente como considerada completamente
5 divulgada.

Mientras las realizaciones preferidas del invento son
ilustradas mediante lo anterior, se debe entender que el
invento no está limitando a las instrucciones precisas
10 divulgadas en la presente y que el derecho a todas las
modificaciones que están dentro del alcance de las siguientes
reivindicaciones es reservado.

Reivindicaciones:

1. Una composición inmunogénica que comprende por lo menos 2 proteínas de *S. pneumoniae* seleccionadas a partir de la familia tríada de polihistidina (phtX), la familia de proteínas de unión de colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, truncados LytX, proteínas quiméricas de truncados CbpX truncado-LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 la cual comprende una proteína proveniente de la familia tríada de polihistidina (phtX) y otra proteína seleccionada a partir del grupo que consiste de la familia de proteínas de unión de colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, truncados LytX, proteínas quiméricas de truncados CbpX truncado-LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 la cual comprende una proteína seleccionada a partir del grupo que consiste de la familia de proteínas de unión de colina (CbpX), truncados de CbpX, y proteínas quiméricas de truncados CbpX truncado-LytX y otra proteína seleccionada a partir del grupo que consiste de la familia tríada de polihistidina (phtX), familia LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133.
4. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-3 en donde PhtX es PhtA, PhtB, ó PhtD.
5. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-4 en donde CbpX es bpA ó PspC.

6. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-5 en donde la cual adicionalmente comprende un co-adyuvante.
- 5 7. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la reivindicación 6.
8. Un método para producir una respuesta inmune al inmunizar un mamífero con la composición inmunogénica de la
10 reivindicación 1-6.
9. Un método para prevenir o mejorar una infección por estreptococo en pacientes mayores a 55 años de edad, el cual comprende administrar una cantidad segura y efectiva de la
15 vacuna de la reivindicación 7 a dichos pacientes.
10. El uso de la vacuna de la reivindicación 7 en la fabricación de un medicamento para la prevención de neumonía en pacientes mayores de 55 años de edad.
20
11. Un método para prevenir o mejorar la otitis media en bebés, el cual comprende administrar una cantidad segura y efectiva de la vacuna de la reivindicación 7 a dichos
pacientes.
- 25
12. Un método para fabricar una vacuna según se reivindica en la reivindicación 7, el cual comprende los pasos de: seleccionar y aislar dos proteínas diferentes de *S. pneumoniae*; y mezclar dichas proteínas entre sí con un
30 vehículo farmacéuticamente aceptable.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

El presente invento se relaciona con una combinación de dos o más proteínas de *S. pneumoniae*, su fabricación y uso en
5 medicina como vacuna. Tales combinaciones son particularmente útiles para la protección de bebés y personas de la tercera edad contra infecciones estreptocóccicas.

Figure 1, seropositivity % in infants

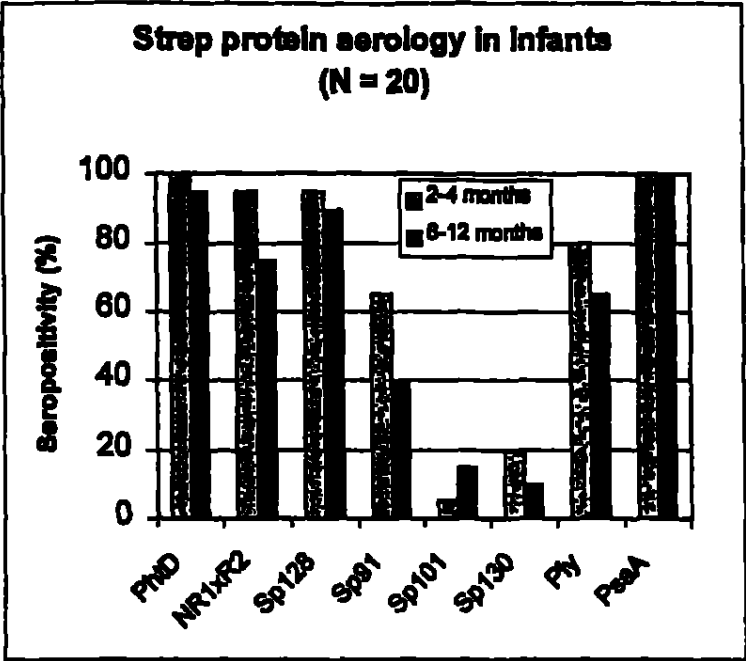
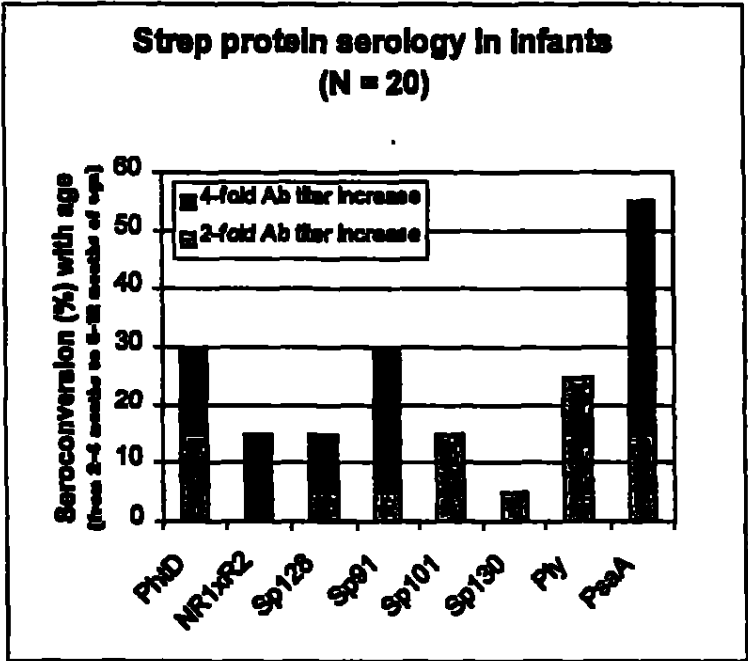


Figure 2, seroconversion with age in infants



59

Figure 3, mid-point titers in young adults

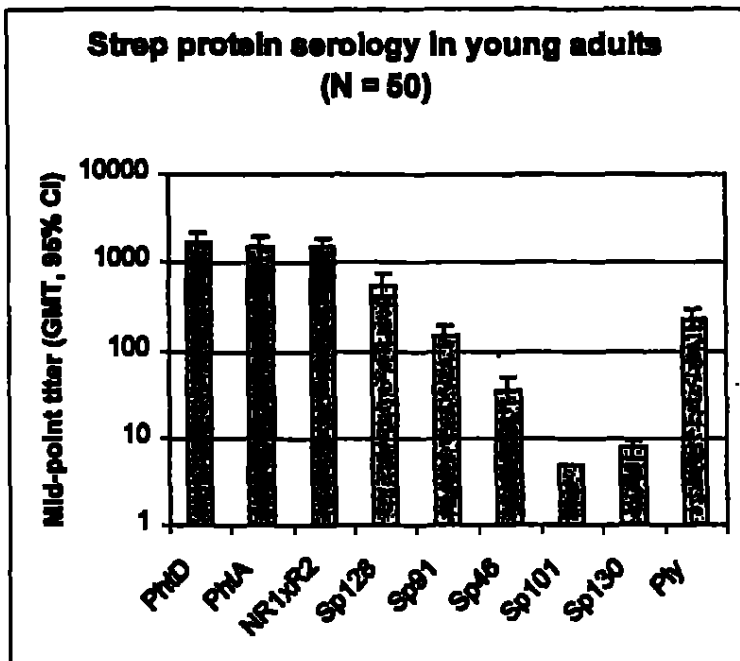


Figure 4, seropositivity % in young adults

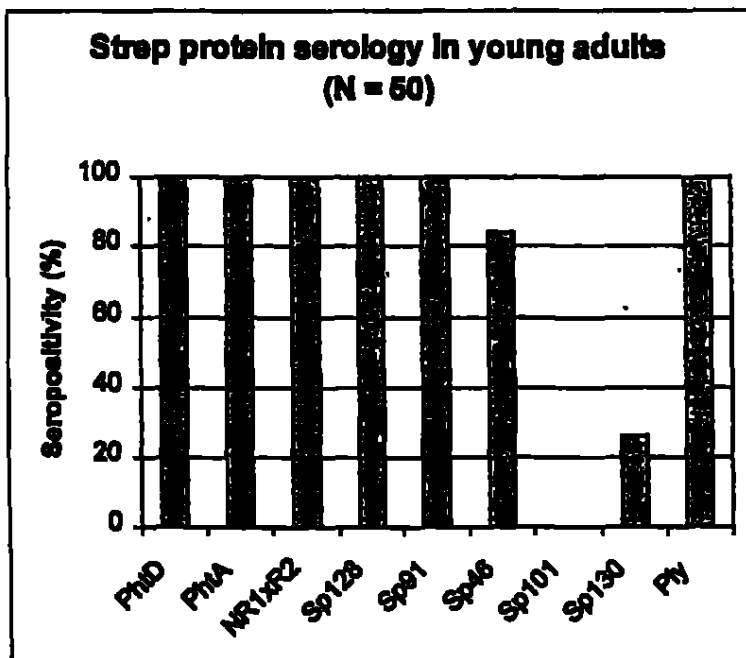


Figure 5, mid-point titers in elderly people

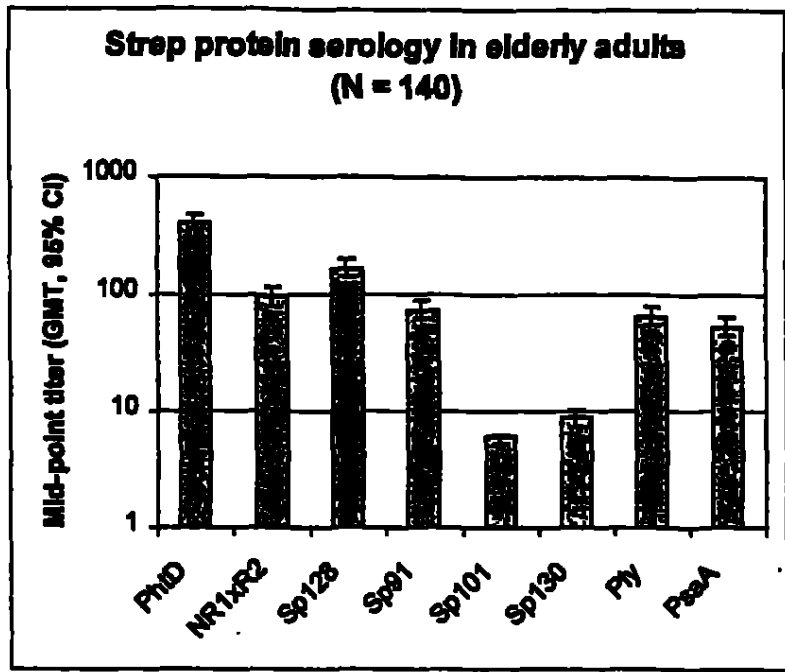
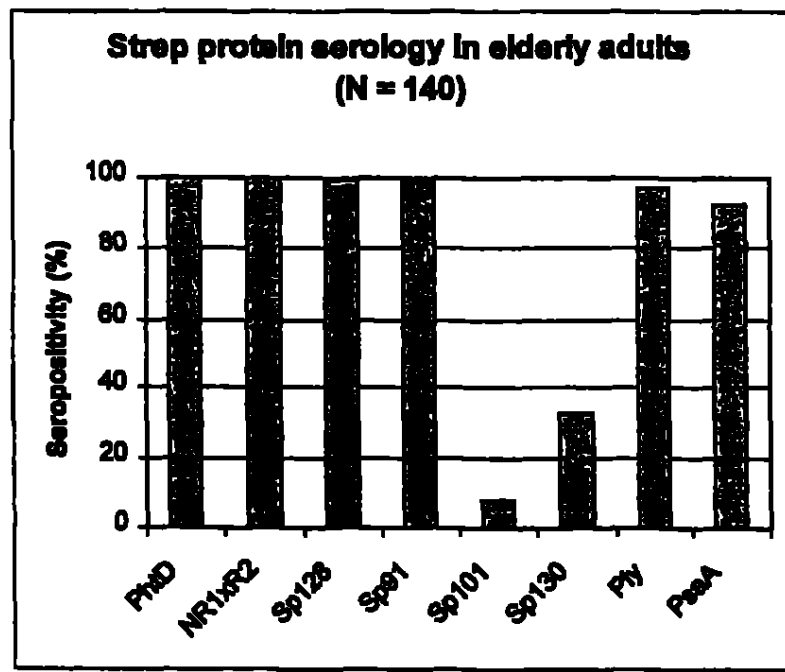


Figure 6, Seropositivity % in elderly people



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference MJL/B45283		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP01/10570	International filing date (day/month/year) 12/09/2001	Priority date (day/month/year) 15/09/2000	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/09			
Applicant SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A et al.			
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet. ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of 2 sheets.			
3. This report contains indications relating to the following items: - I ☒ Basis of the report - II ☐ Priority - III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability - IV ☐ Lack of unity of invention - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement - VI ☐ Certain documents cited - VII ☐ Certain defects in the international application - VIII ☐ Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 21/03/2002		Date of completion of this report 11.11.2002	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Tlx 523656 epmu d Fax: +49 89 2369 - 4195		Authorized officer Leber, T Telephone No. +49 89 2369 7195 	

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP01/10570

1. Basis of the report

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

Description, pages:

1-23 as originally filed

Claims, No.:

1-11 as received on 26/09/2002 with letter of 26/09/2002

Drawings, sheets:

1/3-3/3 as originally filed

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

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

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

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

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

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

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

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP01/10570

☐ the drawings, sheets:

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

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

6. Additional observations, if necessary:

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

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

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 7,8,10.

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 7,8,10 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the said claims Nos. .

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

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

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

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

1. Statement

Novelty (N) Yes: Claims 1-6,9,11

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP01/10570

	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-6,9,11
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-6,9,11
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP01/10570

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

1. Claims 7, 8 and 10 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

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

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

1. **Basis for the assessment of novelty, inventive step and industrial applicability**

- 1.1 Reference is made to the following document/s/:

D1: OGUNNIYI A DAVID ET AL: 'Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*.' INFECTION AND IMMUNITY, vol. 68, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 3028-3033, XP001064855 ISSN: 0019-9567

D2: WO 00 37105 A (MEDIMMUNE INC) 29 June 2000 (2000-06-29)

- 1.2 The following document has an earlier priority and filing date than the present application and its subject matter may therefore be of relevance for the

examination of the present application in its regional or national phase.

WO 00 76541 A (UAB RESEARCH FOUNDATION ;AVENTIS PASTEUR (US);
CTS FOR DISEASE CO) 21 December 2000 (2000-12-21)

2. Inventive step

- 2.1** Claim 1 differs from closest prior art document D2 (D2, page 6, lines 10-14, page 8, lines 1-10, page 9, lines 24-29) in that the immunogenic composition contains a mixture of proteins which not only consists of members of the Poly Histidine Triad family, but also of other proteins (e.g. the Choline Binding Protein Family (CbpX), pneumolysin etc.).

The technical problem appears to be the provision of an mixture of alternative proteins for a immunogenic composition.

The skilled person confronted with the above technical problem would consult the literature for other immunogenic proteins. Document D1 discloses a vaccine for *S. pneumoniae*. The preparation consists of three pneumococcal proteins, i.e. pneumolysin, PspA and PsaA (D1, Abstract; pages 3029-3031). D1 moreover indicates that a logical extension of the study disclosed therein would be the investigation of the protective effects resulting from the addition of other immunogenic proteins in the protein mixture used for vaccination. A member of the Choline Binding Protein Family (CbpA) is mentioned as a candidate to try. Although the Poly Histidine Triad family is not explicitly mentioned in D1, the skilled person would in the light of the indication provided in D1, combine the proteins disclosed in D1 and D2 to solve the above technical problem. An inventive step can therefore not be acknowledged for claim 1 (Art 33(3) PCT).

- 2.2** Claim 2, which refers to a further alternative immunogenic composition, claim 6, which refers to the immunogenic composition as such and claim 11, which refers to the preparation of the vaccine of claim 6, lack an inventive step (Art 33(3) PCT) for the same reasons as claim 1 (see item 2.1 above).

- 2.3** Claim 9 refers to the use of the vaccine of claim 6 in the manufacture of a

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP01/10570

medicament for the prevention of pneumonia in patients over 55 years of age. Claim 9 differs from closest prior art document D1 in that it specifies the therapeutic application of the vaccine to individuals over 55 years of age whereas D1 discloses that *S. pneumoniae* infections are most dangerous for children under the age of 5 years, the elderly and immunocompromised individuals (e.g. D1, page 3028, left column).

The technical problem appears to be to select a particular group of individuals for vaccination. The solution referred to in claim 10 is the group of individuals of over 55 years.

In view of the common knowledge that the elderly are particularly endangered by *S. pneumoniae* and the lack of any particular effect associated with the solution provided in claim 9, it appears that no inventive step can be acknowledged (Art 33(3) PCT).

- 2.4 Dependent claims 3-5 appear not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT in respect of inventive step (Art 33(3) PCT).

3. Industrial applicability

- 3.1 The subject-matter disclosed in the claims 1-6, 9 and 11 of the present application appears to be industrially applicable (Art 33(4) PCT).

החברות החדשות הן:

26-09-2002

26/09 '02 18:08 FAX 0208 975 2773.

EP0110570

0005

73

69

11. A method of making a vaccine as claimed in claim 6 comprising the steps of selecting and isolating two different *S. pneumonia* proteins; and mixing said proteins together with a pharmaceutically acceptable carrier.

AMENDED SHEET

Printed on 26/09/2002 19:14

Printed on 26/09/2002 19:14



24
90

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
Carlos R. Olarte
Apoderado
Smithkline Beecham Biologicals S.A.

Oficio N° 07265

ASUNTO:	Radicación N°	03-021874
	Solicitud Internacional	PCT/EP2001/10570
	Fecha inicio fase nacional	15/04/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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

- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 28-k) Decisión 486).
- ☐ La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsecuentes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredite la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
- ☐ El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 28-27 D-486, Circular única 5.2.9).

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

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


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

05 SET. 2003

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