

67



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N°

03-65841

54. TÍTULO

VACUNA MULTIVALENTE CONJUGADA DE POLISACARIO

MENINGOCOCICO-PROTEINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A 61k 47/48.

1

71. SOLICITANTE

AVENTIS PASTEUR, INC.

DOMICILIO

Swiftwater, Estado de Pennsylvania, Estados Unidos de América.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

Código No. 1092

22. BOGOTÁ, D. C.

EF

03 065841 00

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Folios: 111

Radicación: 03065841 00000000

Fecha (ANI): 2003-08-01 16:48:09

Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1	SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.		
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.		
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: AVENTIS PASTEUR, INC. Dirección: 1 Discovery Drive, Swiftwater, Pennsylvania 18370-0187, Estados Unidos de América. Domicilio: Swiftwater, Pennsylvania, Estados Unidos de América	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número: _____		
3 REPRESENTANTE APODERADO	Nombre: EMILIO FERRERO Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax:: 217 92 11 E-mail: <u>clientes@camyp.com.</u> Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número: <u>438.019</u> T.P. <u>31.929</u>		
4 INVENTOR (ES) (72)	Robert P. RYALL Apartment 207, 411 1 / 2 Main Street, Stroudsburg, Pennsylvania 18380, Estados Unidos de América.			
5	PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US02/01963</u> Publicación Internacional No. <u>WO 02/058737</u> Fecha: <u>22 de enero de 2002</u> Fecha : <u>1 de agosto de 2002</u>			
6	Título (54) <u>VACUNA MULTIVALENTE CONJUGADA DE POLISACARIDO</u> <u>MENINGOCÓCICO-PROTEÍNA</u>			
7	Clasificación Internacional (51) <u>A81K 47/48</u>			
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>US.</u>	(32) Fecha <u>23 de enero de 2001</u>	(31) Número de Solicitud <u>60/263,435</u>

9

Comprobante de pago No.: 03 - 50.616 Fecha: 21 de julio de 2003

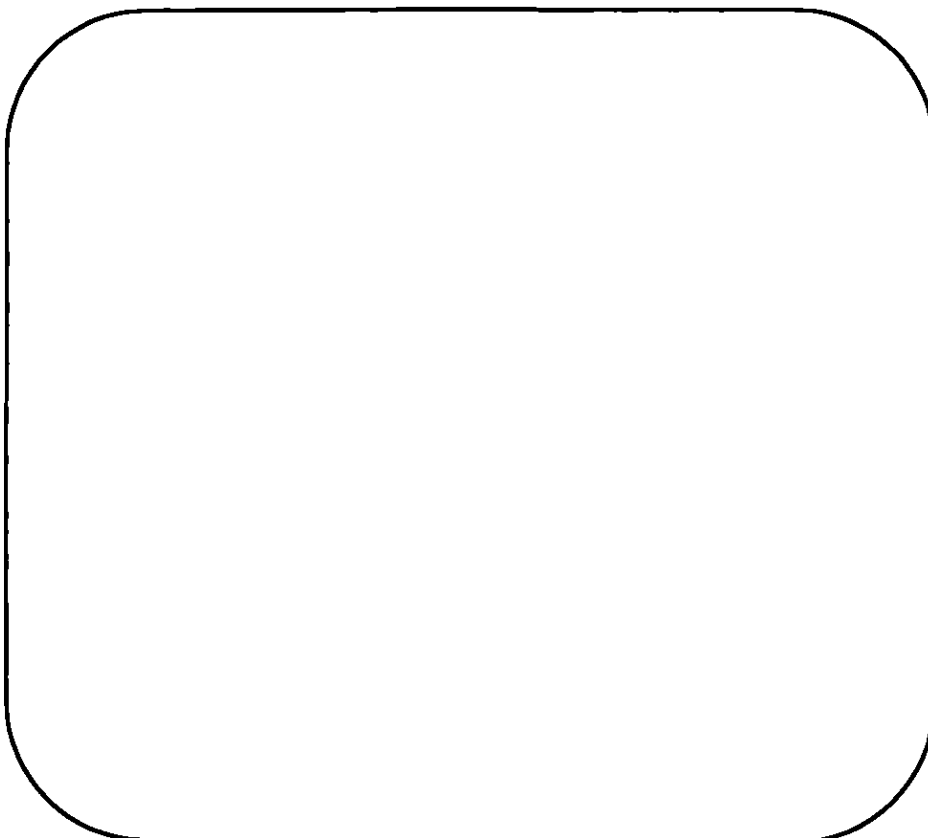
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 400.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita 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 efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA: 

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

ld-2

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/058737 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 47/48 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CQ, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/01963 / (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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).
- (22) International Filing Date: 22 January 2002 (22.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/263,435 23 January 2001 (23.01.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): AVENTIS PASTEUR [US/US]; 1 Discovery Drive, Swiftwater, PA 18370-0187 (US).
- (72) Inventor; and /
- (73) Inventor/Applicant (for US only): RYALL, Robert, P. [US/US]; Apartment 207, 411 1/2 Main Street, Stroudsburg, PA 18360 (US).
- (74) Agent: GREENFIELD, Michael, S.; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, Suite 3200, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).
- Declaration under Rule 4.17:
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- 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.

WO 02/058737 A2

(54) Title: MULTIVALENT MENINGOCOCCAL POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATE VACCINE

(57) Abstract: The present invention describes a combined vaccine that offers broad protection against meningococcal disease caused by the pathogenic bacterial *Neisseria meningitidis*. The vaccine is comprised of four distinct polysaccharide-protein conjugates that are formulated as a single dose of vaccine. Purified capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W-135, and Y are chemically activated and selectively attached to a carrier protein by means of a covalent chemical bond, forming polysaccharide-protein conjugates capable of eliciting long-lasting immunity to a variety of *N. meningitidis* strains in children as well as adults.

5

MULTIVALENT MENINGOCOCCAL POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATE VACCINE

[0001] This application claims the benefit of U.S. provisional application no. 60/263,435, filed January 23, 2001.

BACKGROUND OF THE INVENTION**Field of the Invention**

[0002] The present invention relates to the field of medicine generally, and more specifically to microbiology, immunology, vaccines and the prevention of infection by a bacterial pathogen by immunization.

Summary of the Related Art

[0003] *Neisseria meningitidis* is a leading cause of bacterial meningitis and sepsis throughout the world. The incidence of endemic meningococcal disease during the last thirty years ranges from 1 to 5 per 100,000 in the developed world, and from 10 to 25 per 100,000 in developing countries (Reido, F.X., et. al. 1995). During epidemics the incidence of meningococcal disease approaches 1000 per 1000,000. There are approximately 2,600 cases of bacterial meningitis per year in the United States, and on average 330,000 cases in developing countries. The case fatality rate ranges between 10 and 20%.

[0004] Pathogenic meningococci are enveloped by a polysaccharide capsule that is attached to the outer membrane surface of the organism. Thirteen different serogroups of meningococci have been identified on the basis of the immunological specificity of the capsular polysaccharide (Frasch, C.E., et. al. 1985). Of these thirteen serogroups, five cause the majority of meningococcal disease; these include serogroups A, B, C, W135, and Y. Serogroup A is responsible for most epidemic disease. Serogroups B, C, and Y cause the majority of endemic disease and localized outbreaks.

[0005] The human naso-oro-pharyngeal mucosa is the only known natural reservoir of *Neisseria meningitidis*. Colonization takes place both at the exterior surface of the mucosal cell and the subepithelial tissue of the nasopharynx. Carriage of meningococci can last for months. Spreading of meningococci occurs by direct contact or via air droplets. Meningococci become invasive by passing through the mucosal epithelium via phagocytic vacuoles as a result of endocytosis. Host defense of invasive meningococci is dependent upon complement-mediated bacteriolysis. The serum antibodies that are responsible for complement-mediated bacteriolysis are directed in large part against the outer capsular polysaccharide.

[0006] Vaccines based on meningococcal polysaccharide have been described which elicit an immune response against the capsular polysaccharide. These antibodies are capable of com-

plement-mediated bacteriolysis of the serogroup specific meningococci. The meningococcal polysaccharide vaccines were shown to be efficacious in children and adults (Peltola, H., et. al. 1977 and Artenstein, M.S., et. al. 1970), but the efficacy was limited in infants and young children (Reingold, A.L., et. al. 1985). Subsequent doses of the polysaccharide in younger populations elicited a weak or no booster response (Goldschneider, I., et. al. 1973 and Gold, R., et. al. 1977). The duration of protection elicited by the meningococcal polysaccharide vaccines is not long lasting, and has been estimated to be between 3 to 5 years in adults and children above four years of age (Brandt, B., et. al. 1975, Käyhty, H., et. al. 1980, and Ceesay, S. J., et. al. 1993). For children from one to four years old the duration of protection is less than three years (Reingold, A.L., et. al. 1985).

[0007] Polysaccharides are incapable of binding to the major histocompatibility complex molecules, a prerequisite for antigen presentation to and stimulation of T-helper lymphocytes, i.e., they are T-cell independent antigens. Polysaccharides are able to stimulate B lymphocytes for antibody production without the help of T-helper lymphocytes. As a result of the T-independent stimulation of the B lymphocytes, there is a lack of memory induction following immunization by these antigens. The polysaccharide antigens are capable of eliciting very effective T-independent responses in adults, but these T-independent responses are weak in the immature immune system of infants and young children.

[0008] T-independent polysaccharide antigens can be converted to T-dependent antigens by covalent attachment of the polysaccharides to protein molecules ("carriers" or "carrier proteins"). B cells that bind the polysaccharide component of the conjugate vaccine can be activated by helper T cells specific for peptides that are a part of the conjugated carrier protein. The T-helper response to the carrier protein serves to augment the antibody production to the polysaccharide.

[0009] The serogroup B polysaccharide has been shown to be poorly to non-immunogenic in the human population (Wyle, F.A., et. al. 1972). Chemical attachment of this serogroup polysaccharide to proteins has not significantly altered the immune response in laboratory animals (Jennings, H. J., et. al. 1981). The reason for the lack of immune response to this serogroup polysaccharide is thought to arise from structural similarities between the serogroup B polysaccharide and polysialylated host glycoproteins, such as the neural cell adhesion molecules.

[0010] A meningococcal conjugate vaccine based on serogroup C polysaccharide has been described. This monovalent vaccine elicits a strong functional antibody response to the capsular polysaccharide present on strains of *N. meningitidis* corresponding to serogroup C. Such a vaccine is only capable of protecting against disease caused by serogroup C bacteria.

7

[0011] Existing vaccines based on meningococcal polysaccharide are of limited use in young children and do not provide long-lasting protection in adults. The only meningococcal vaccine which has been shown to be capable of eliciting long-lasting protection in all groups, including children, at risk for meningococcal infection is based on a polysaccharide from a single serogroup of *N. meningitidis* and provides no protection against infection by other serogroups. Thus, a need exists for a meningococcal conjugate vaccine capable of conferring broad, long-lived protection against meningococcal disease in children and adults at risk for meningococcal infection. The multivalent meningococcal polysaccharides of the present invention solve this need by providing vaccine formulations in which immunogenic polysaccharides from the major pathogenic serogroups of *N. meningitidis* have been converted to T-dependent antigens through conjugations to carrier proteins.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0012] The present invention provides immunological compositions for treatment of meningococcal polysaccharide-protein conjugates caused by pathogenic *Neisseria meningitidis*.

[0013] The present invention provides immunological compositions comprising two or more protein-polysaccharide conjugates, wherein each of the conjugates comprises a capsular polysaccharide from *N. meningitidis* conjugated to a carrier protein.

[0014] The present invention provides immunological compositions comprising two or more distinct protein-polysaccharide conjugates, wherein each of the conjugates comprises a capsular polysaccharide from a different serogroup of *N. meningitidis* conjugated to a carrier protein.

[0015] The present invention provides vaccines for meningococcal polysaccharide-protein conjugates caused by pathogenic *Neisseria meningitidis*. The present invention provides multivalent meningococcal vaccines comprised of immunologically effective amounts of from two to four distinct protein-polysaccharide conjugates, wherein each of the conjugates contains a different capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, and wherein each capsular polysaccharide is selected from the group consisting of capsular polysaccharide from serogroups A, C, W-135 and Y.

[0016] The present invention also provides methods of manufacture of a multivalent meningococcal polysaccharide-protein composition comprising purifying two or more capsular polysaccharides from pathogenic *Neisseria meningitidis*; conjugating the purified polysaccharides to one or more carrier proteins and combining the conjugates to make the multivalent meningococcal polysaccharide-protein composition.

[0017] The present invention further provides a method of inducing an immunological response to capsular polysaccharide of *N. meningitidis* comprising administering an immunologically effective amount of the immunological composition of the invention to a human or animal.

[0018] The present invention provides a multivalent meningococcal vaccine comprised of immunologically effective amounts of from two to four distinct protein-polysaccharide conjugates, wherein each of the conjugates contains a different capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, and wherein each capsular polysaccharide is selected from the group consisting of capsular polysaccharide from serogroups A, C, W-135 and Y.

[0019] The present invention provides a method of protecting a human or animal susceptible to infection from *N. meningitidis* comprising administering an immunologically effective dose of the vaccine of the invention to the human or animal.

[0020] All patents, patent applications, and other publications recited herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0021] The present invention comprises an immunological composition of two or more distinct protein-polysaccharide conjugates, wherein each of the conjugates comprises a capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein. Thus, the present invention includes compositions that comprise two or more different capsular polysaccharides conjugated to one or more carrier protein(s).

[0022] Capsular polysaccharides can be prepared by standard techniques known to those of skill in the art (ref). In the present invention capsular polysaccharides prepared from serogroups A, C, W-135 and Y of *N. meningitidis* are preferred.

[0023] In a preferred embodiment, these meningococcal serogroup conjugates are prepared by separate processes and formulated into a single dosage formulation. For example, capsular polysaccharides from serogroups A, C, W-135 and Y of *N. meningitidis* are separately purified.

[0024] In a preferred embodiment of the present invention the purified polysaccharide is depolymerized and activated prior to conjugation to a carrier protein. In a preferred embodiment of the present invention capsular polysaccharides of serogroups A, C, W-135, and Y from *N. meningitidis* are partially depolymerized using mild oxidative conditions.

[0025] The depolymerization or partial depolymerization of the polysaccharides may then be followed by an activation step. By "activation" is meant chemical treatment of the polysaccharide to provide chemical groups capable of reacting with the carrier protein. A preferred activation

method involves treatment with adipic acid dihyrazide in physiological saline at pH 5.0 ± 0.1 for approximately two hours at 15 to 30°C. One process for activation is described in U.S. Patent 5,965,714.

[0026] Once activated, the capsular polysaccharides may then be conjugated to one or more carrier proteins. In a preferred embodiment of the present invention each capsular polysaccharide is separately conjugated to a single carrier protein species. In a preferred embodiment the capsular polysaccharides from serogroups A, C, W-135 and Y of *N. meningitidis* are each separately conjugated to the same carrier protein species.

[0027] Carrier proteins may include inactivated bacterial toxins such as diphtheria toxoid, CRM197, tetanus toxoid, pertussis toxoid, *E. coli* LT, *E. coli* ST, and exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial outer membrane proteins such as, outer membrane complex c (OMPC), porins, transferrin binding proteins, pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), or pneumococcal adhesin protein (PsaA), could also be used. Other proteins, such as ovalbumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) or purified protein derivative of tuberculin (PPD) may also be used as carrier proteins. Carrier proteins are preferably proteins that are non-toxic and non-reactogenic and obtainable in sufficient amount and purity. Carrier proteins should be amenable to standard conjugation procedures. In a preferred embodiment of the present invention diphtheria toxin purified from cultures of *Corynebacteria diphtheriae* and chemically detoxified using formaldehyde is used as the carrier protein.

[0028] After conjugation of the capsular polysaccharide to the carrier protein, the polysaccharide-protein conjugates may be purified (enriched with respect to the amount of polysaccharide-protein conjugate) by a variety of techniques. One goal of the purification step is to remove the unbound polysaccharide from the polysaccharide-protein conjugate. One method for purification, involving ultrafiltration in the presence of ammonium sulfate, is described in U.S. Patent 6,146,902. Alternatively, conjugates can be purified away from unreacted protein and polysaccharide by any number of standard techniques including, *inter alia*, size exclusion chromatography, density gradient centrifugation, hydrophobic interaction chromatography or ammonium sulfate fractionation. See, e.g., P.W. Anderson, et. al. (1986). *J. Immunol.* **137**: 1181-1186. See also H. J. Jennings and C. Lugowski (1981) *J. Immunol.* **127**: 1011-1018.

[0029] After conjugation of the polysaccharide and carrier protein the immunological compositions of the present invention are made by combining the various polysaccharide-protein conjugates. The immunological compositions of the present invention comprise two or more different capsular polysaccharides conjugated to one or more carrier protein(s). A preferred embodiment

10

of the present invention is a bivalent immunological composition comprising capsular polysaccharides from serogroups A and C of *N. meningitidis* separately conjugated to diphtheria toxoid. More preferably the present invention is a tetravalent immunological composition comprising capsular polysaccharides from serogroups A, C, W-135 and Y of *N. meningitidis* separately conjugated to diphtheria toxoid.

[0030] Preparation and use of carrier proteins, and a variety of potential conjugation procedures, are well known to those skilled in the art. Conjugates of the present invention can be prepared by such skilled persons using the teachings contained in the present invention as well as information readily available in the general literature. Guidance can also be obtained from any one or all of the following U.S. patents, the teachings of which are hereby incorporated in their entirety by reference: U.S. 4,356,170; U.S. 4,619,828; U.S. 5,153,312; U.S. 5,422,427 and U.S. 5,445,817.

[0031] The immunological compositions of the present invention are made by separately preparing polysaccharide-protein conjugates from different meningococcal serogroups and then combining the conjugates. The immunological compositions of the present invention can be used as vaccines. Formulation of the vaccines of the present invention can be accomplished using art recognized methods. The vaccine compositions of the present invention may also contain one or more adjuvants. Adjuvants include, by way of example and not limitation, aluminum adjuvants, Freund's Adjuvant, BAY, DC-chol, pcpp, monophosphoryl lipid A, CpG, QS-21, cholera toxin and formyl methionyl peptide. See, e.g., Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach, 1995 (M.F. Powell and M. J. Newman, eds., Plenum Press, NY). The adjuvant is preferably an aluminum adjuvant, such as aluminum hydroxide or aluminum phosphate.

[0032] As demonstrated below, the vaccines and immunological compositions according to the invention elicit a T-dependent-like immune response in various animal models, whereas the polysaccharide vaccine elicits a T-independent-like immune response. Thus, the compositions of the invention are also useful research tools for studying the biological pathways and processes involved in T-dependent-like immune responses to *N. meningitidis* antigens.

[0033] The amount of vaccine of the invention to be administered a human or animal and the regime of administration can be determined in accordance with standard techniques well known to those of ordinary skill in the pharmaceutical and veterinary arts taking into consideration such factors as the particular antigen, the adjuvant (if present), the age, sex, weight, species and condition of the particular animal or patient, and the route of administration. In the present invention, the amount of polysaccharide-protein carrier to provide an efficacious dose for vaccination

against *N. meningitidis* can be from between about 0.02 µg to about 5 µg per kg body weight. In a preferred composition and method of the present invention the dosage is between about 0.1 µg to 3 µg per kg of body weight. For example, an efficacious dosage will require less antibody if the post-infection time elapsed is less since there is less time for the bacteria to proliferate. In like manner an efficacious dosage will depend on the bacterial load at the time of diagnosis. Multiple injections administered over a period of days could be considered for therapeutic usage.

[0034] The multivalent conjugates of the present invention can be administered as a single dose or in a series (i.e., with a "booster" or "boosters"). For example, a child could receive a single dose early in life, then be administered a booster dose up to ten years later, as is currently recommended for other vaccines to prevent childhood diseases.

[0035] The booster dose will generate antibodies from primed B-cells, i.e., an anamnestic response. That is, the multivalent conjugate vaccine elicits a high primary (i.e., following a single administration of vaccine) functional antibody response in younger populations when compared to the licensed polysaccharide vaccine, and is capable of eliciting an anamnestic response (i.e., following a booster administration), demonstrating that the protective immune response elicited by the multivalent conjugate vaccine of the present invention is long-lived.

[0036] Compositions of the invention can include liquid preparations for orifice, e.g., oral, nasal, anal, vaginal, peroral, intragastric, mucosal (e.g., perinatal, alveolar, gingival, olfactory or respiratory mucosa) etc., administration such as suspensions, syrups or elixirs; and, preparations for parenteral, subcutaneous, intradermal, intramuscular, intraperitoneal or intravenous administration (e.g., injectable administration), such as sterile suspensions or emulsions. Intravenous and parenteral administration are preferred. Such compositions may be in admixture with a suitable carrier, diluent, or excipient such as sterile water, physiological saline, glucose or the like. The compositions can also be lyophilized. The compositions can contain auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, gelling or viscosity enhancing additives, preservatives, flavoring agents, colors, and the like, depending upon the route of administration and the preparation desired. Standard texts, such as "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985, incorporated herein by reference, may be consulted to prepare suitable preparations, without undue experimentation.

[0037] Compositions of the invention are conveniently provided as liquid preparations, e.g., isotonic aqueous solutions, suspensions, emulsions or viscous compositions that may be buffered to a selected pH. If digestive tract absorption is preferred, compositions of the invention can be in the "solid" form of pills, tablets, capsules, caplets and the like, including "solid" prepara-

tions which are time-released or which have a liquid filling, e.g., gelatin covered liquid, whereby the gelatin is dissolved in the stomach for delivery to the gut. If nasal or respiratory (mucosal) administration is desired, compositions may be in a form and dispensed by a squeeze spray dispenser, pump dispenser or aerosol dispenser. Aerosols are usually under pressure by means of a hydrocarbon. Pump dispensers can preferably dispense a metered dose or a dose having a particular particle size.

[0038] Liquid preparations are normally easier to prepare than gels, other viscous compositions, and solid compositions. Additionally, liquid compositions are somewhat more convenient to administer, especially by injection or orally, to animals, children, particularly small children, and others who may have difficulty swallowing a pill, tablet, capsule or the like, or in multi-dose situations. Viscous compositions, on the other hand, can be formulated within the appropriate viscosity range to provide longer contact periods with mucosa, such as the lining of the stomach or nasal mucosa.

[0039] Obviously, the choice of suitable carriers and other additives will depend on the exact route of administration and the nature of the particular dosage form, e.g., liquid dosage form (e.g., whether the composition is to be formulated into a solution, a suspension, gel or another liquid form), or solid dosage form (e.g., whether the composition is to be formulated into a pill, tablet, capsule, caplet, time release form or liquid-filled form).

[0040] Solutions, suspensions and gels, normally contain a major amount of water (preferably purified water) in addition to the active ingredient. Minor amounts of other ingredients such as pH adjusters (e.g., a base such as NaOH), emulsifiers or dispersing agents, buffering agents, preservatives, wetting agents, jelling agents, (e.g., methylcellulose), colors and/or flavors may also be present. The compositions can be isotonic, i.e., it can have the same osmotic pressure as blood and lacrimal fluid.

[0041] The desired isotonicity of the compositions of this invention may be accomplished using sodium tartrate, propylene glycol or other inorganic or organic solutes. Sodium chloride is preferred particularly for buffers containing sodium ions.

[0042] Viscosity of the compositions may be maintained at the selected level using a pharmaceutically acceptable thickening agent. Methylcellulose is preferred because it is readily and economically available and is easy to work with. Other suitable thickening agents include, for example, xanthan gum, carboxymethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, carbomer, and the like. The preferred concentration of the thickener will depend upon the agent selected. The important

point is to use an amount that will achieve the selected viscosity. Viscous compositions are normally prepared from solutions by the addition of such thickening agents.

[0043] A pharmaceutically acceptable preservative can be employed to increase the shelf life of the compositions. Benzyl alcohol may be suitable, although a variety of preservatives including, for example, parabens, thimerosal, chlorobutanol, or benzalkonium chloride may also be employed. A suitable concentration of the preservative will be from 0.02% to 2% based on the total weight although there may be appreciable variation depending upon the agent selected.

[0044] Those skilled in the art will recognize that the components of the compositions must be selected to be chemically inert with respect to the *N. meningitidis* polysaccharide-protein carrier conjugates.

[0045] The invention will be further described by reference to the following illustrative, non-limiting examples setting forth in detail several preferred embodiments of the inventive concept. Other examples of this invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the spirit of the invention.

EXAMPLES

Example 1

*Preparation of Neisseria meningitidis
serogroups A, C, W-135, and Y purified capsular polysaccharides powders*

Crude paste preparation

[0046] Separately, *Neisseria meningitidis* serogroup A, C, W135, and Y wet frozen seed cultures were thawed and recovered with the aid of liquid Watson Scherp medium and planted in Blake bottles containing Mueller Hinton agar medium. The Blake were incubated at 35 to 37°C in a CO₂ atmosphere for 15 to 19 hours. Following the incubation period, the growth from the Blake bottles were dislodged and added to 4L flasks containing Watson Scherp medium. The flasks were incubated at 35 to 37°C for 3 to 7 hours on a platform shaker. The contents of the 4L flasks were transferred to a fermenter vessel containing Watson Scherp medium. The fermenter vessel was incubated at 35 to 37°C for 7 to 12 hours controlling dissolved oxygen content and pH with supplement feed and antifoam additions. After the incubation period, the contents of the fermentor vessel were transferred to a 500L tank, Cetavlon was added, and the material mixed for 1 hours. The Cetavlon treated growth was centrifuged at approximately 15,000 to 17,000xg at a flow rate of approximately 30 to 70 liters per hours. The crude polysaccharide was precipitated from the supernatant with a second Cetavlon precipitation. Cetavlon was added to the supernatant and the material mixed for at least 1 hour at room temperature. The material

/X

was stored at 1 to 5°C for 8 to 12 hours. The precipitated polysaccharide was collected centrifugation at approximately 45,000 to 50,000xg at a flow rate of 300 to 400ml per minute. The collected paste was stored at -60°C or lower until further processed.

Purified polysaccharide powder preparation

[0047] The inactivated paste was thawed and transferred to a blender. The paste was blended with 0.9M calcium chloride to yield a homogeneous suspension. The suspension was centrifuged at approximately 10,000xg for 15 minutes. The supernatant was decanted through a lint free pad into a container as the first extract. A second volume of 0.9M calcium chloride was added to the paste, and blended to yield a homogeneous suspension. The suspension was centrifuged as above, and the supernatant combined with the supernatant from the first extraction. A total of four extractions were performed, and the supernatants pooled. The pooled extracts were concentrated by ultrafiltration using 10-30kDA MWCO spiral wound ultrafiltration units.

[0048] Magnesium chloride was added to the concentrated, and the pH adjusted to 7.2 to 7.5 using sodium hydroxide. DNase and RNase were added to the concentrate, and incubated at 25 to 28°C with mixing for 4 hours. Ethanol was added to a concentration of 30 to 50%. Precipitated nucleic acid and protein were removed by centrifugation at 10,000xg for 2 hours. The supernatant was recovered and the polysaccharide precipitated by adding ethanol to 80% and allowing it to stand overnight at 1 to 5°C. The alcohol was siphoned off, and the precipitated polysaccharide was centrifuged for 5 minutes at 10,000xg. The precipitated polysaccharide was washed with alcohol. The polysaccharide was washed with acetone, centrifuged at 15 to 20 minutes at 10,000xg. The polysaccharide was dried under vacuum. The initial polysaccharide powder was dissolved into sodium acetate solution. Magnesium chloride was added and the pH adjusted to 7.2 to 7.5 using sodium hydroxide solution. DNase and RNase were added to the solution and incubated at 25 to 28°C with mixing for 4 hours to remove residual nucleic acids. After incubation with these enzymes, an equal volume of sodium acetate-phenol solution was added to the polysaccharide-enzyme mixture, and placed on a platform shaker at 1 to 5°C for approximately 30 minutes. The mixture was centrifuged at 10,000xg for 15 to 20 minutes. The upper aqueous layer was recovered and saved. An equal volume of sodium acetate-phenol solution was added to the aqueous layer, and extracted as above. A total of four extractions were performed to remove protein and endotoxin from the polysaccharide solution. The combined aqueous extracts were diluted up to ten fold with water for injection, and diafiltered against 10 volumes of water for injection. Calcium chloride was added to the diafiltered polysaccharide. The polysaccharide was precipitated overnight at 1 to 5°C by adding ethanol to 80%. The alcohol super-

natant was withdrawn, and the polysaccharide collected by centrifugation at 10,000xg for 15 minutes. The purified polysaccharide was washed two times with ethanol, and once with acetone. The washed powder was dried under vacuum in a desiccator. The dried powder was stored at -30°C or lower until processed onto conjugate.

Example 2

Depolymerization of Neisseria meningitidis serogroups A,C, W135, and Y purified capsular polysaccharide powder

[0049] Materials used in the preparation include purified capsular polysaccharide powders from *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W-135, and Y (prepared in accordance with Example 1), sterile 50mM sodium acetate buffer, pH 6.0, sterile 1N hydrochloric acid, sterile 1N sodium hydroxide, 30% hydrogen peroxide, and sterile physiological saline (0.85% sodium chloride).

[0050] Each serogroup polysaccharide was depolymerized in a separate reaction. A stainless steel tank was charged with up to 60g of purified capsular polysaccharide powder. Sterile 50mM sodium acetate buffer, pH 6.0 was added to the polysaccharide to yield a concentration of 2.5g polysaccharide per liter. The polysaccharide solution was allowed to mix at 1 to 5°C for 12 to 24 hours to effect solution. The reaction tank was connected to a heat exchanger unit. Additional 50mM sodium acetate buffer, pH 6.0, was added to dilute the polysaccharide to reaction concentration of 1.25g per liter. The polysaccharide solution was heated to 55°C±0.1. An aliquot of 30% hydrogen peroxide was added to the reaction mixture to yield a reaction concentration of 1% hydrogen peroxide.

[0051] The course of the reaction was monitored by following the change in the molecular size of the polysaccharide over time. Every 15 to 20 minutes, aliquots were removed from the reaction mixture and injected onto a HPSEC column to measure the molecular size of the polysaccharide. When the molecular size of the polysaccharide reached the targeted molecular size, the heating unit was turned off and the polysaccharide solution rapidly cooled to 5°C by circulation through an ice water bath. The depolymerized polysaccharide solution was concentrated to 15g per liters by connecting the reaction tank to an ultrafiltration unit equipped with 3000 MWCO regenerated cellulose cartridges. The concentrated depolymerized polysaccharide solution was diafiltered against 10 volumes of sterile physiological saline (0.85% sodium chloride). The depolymerized polysaccharide was stored at 1 to 5°C until the next process step.

[0052] The molecular size of the depolymerized polysaccharide was determined by passage through a gel filtration chromatography column sold under the tradename "Ultahydrogel™250" that was calibrated using dextran molecular size standards and by multi-angle laser light scatter-

ing. The quantity of polysaccharide was determined by phosphorus content for serogroup A using the method of Bartlett, G.R.J. (1959) *Journal of Biological Chemistry*, 234, pp466-468, and by the sialic acid content for serogroups C, W135 and Y using the method of Svennerholm, L. (1955) *Biochimica Biophysica Acta* 24, pp604-611. The O-acetyl content was determined by the method of Hesterin, S. (1949) *Journal of Biological Chemistry* 180, p249. Reducing activity was determined by the method of Park, J.T. and Johnson, M.J. (1949) *Journal of Biological Chemistry* 181, pp149-151. The structural integrity of the depolymerized polysaccharide was determined by protein ^1H and ^{13}C NMR. The purity of the depolymerized polysaccharide was determined by measuring the LAL (endotoxin) content and the residual hydrogen peroxide content.

Example 3

Derivatization of Neisseria meningitidis serogroups A, C, W-135, and Y depolymerized polysaccharide

[0053] Materials used in this preparation include hydrogen peroxide depolymerized capsular polysaccharide serogroups A, C, W-135, and Y from *Neisseria meningitidis* (prepared in accordance with Example 2), adipic acid dihydrazide, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) for serogroup A only, sodium cyanoborohydride, sterile 1N hydrochloric acid, sterile 1N sodium hydroxide, sterile 1M sodium chloride, and sterile physiological saline (0.85% sodium chloride).

[0054] Each serogroup polysaccharide was derivatized in a separate reaction. A stainless steel tank was charged with the purified depolymerized polysaccharide, and diluted with sterile 0.85% physiological saline to achieve a final reaction concentration of 6g polysaccharide per liter. To this solution was added a concentrated aliquot of adipic acid dihydrazide dissolved in sterile 0.85% physiological saline, in order to achieve a reaction concentration of 1g per liter. For serogroup A only, EDAC was added as a concentrated aliquot dissolved in sterile 0.85% physiological saline, to achieve a reaction concentration of 1g per liter. The pH was adjusted to 5.0 ± 0.1 , and this pH was maintained for 2 hours using sterile 1N hydrochloric acid and sterile 1N sodium hydroxide at room temperature (15 to 30°C). After two hours, a concentrated aliquot of sodium cyanoborohydride, dissolved in 0.85% physiological saline, was added to the reaction mixture to achieve a reaction concentration of 2g per liter. The reaction was stirred at room temperature (15 to 30°C) for 44 hours ± 4 hours while maintaining the pH at 5.5 ± 0.5 . Following this reaction period, the pH was adjusted to 6.0 ± 0.1 , and the derivatized polysaccharide was concentrated to 12g polysaccharide per liter by connecting the reaction tank to a ultrafiltration unit equipped with a 3000 MWCO regenerated cellulose cartridges. The concentrated derivatized polysaccharide

was diafiltered against 30 volumes of 1M sodium chloride, followed by 10 volumes of 0.15M sodium chloride. The tank was disconnected from the ultrafiltration unit and stored at 1 to 5°C for 7 days. The tank was reconnected to an ultrafiltration unit equipped with 3000 MWCO regenerated cellulose cartridges, and diafiltered against 30 volumes of 1M sodium chloride, followed by 10 volumes of 0.15M sodium chloride.

[0055] The molecular size of the derivatized polysaccharide, the quantity of polysaccharide, and the O-acetyl content were measured by the same methods used on the depolymerized polysaccharide. The hydrazide content was measured by the 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid method of Snyder, S.L. and Sobocinski, P.Z. (1975) *Analytical Biochemistry* 64, pp282-288. The structural integrity of the derivatized polysaccharide was determined by proton ^1H and ^{13}C NMR. The purity of the derivatized polysaccharide was determined by measuring the level of unbound hydrazide, the LAL (endotoxin) content, and the residual cyanoborohydride content.

Example 4

Preparation of carrier protein

Preparation of crude diphtheria toxoid protein

[0056] Lyophilized seed cultures were reconstituted and incubated for 16 to 18 hours. An aliquot from the culture was transferred to a 0.5-liter flask containing growth medium, and the culture flask was incubated at 34.5 to 36.5°C on a rotary shaker for 7 to 9 hours. An aliquot from the culture flask was transferred to a 4-liter flask containing growth medium, and the culture flask was incubated at 34.5 to 36.5°C on a rotary shaker for 14 to 22 hours. The cultures from the 4-liter flask were used to inoculate a fermenter containing growth media. The fermenter was incubated at 34.5 to 36.5°C for 70 to 144 hours. The contents of the fermenter were filtered through depth filters into a collection vessel. An aliquot of formaldehyde solution, 37% was added to the harvest to achieve a concentration of 0.2%. The pH was adjusted to 7.4 to 7.6. The harvest was filtered through a 0.2 micron filter cartridge into sterile 20 liter bottles. The bottles were incubated at 34.5 to 36.5°C for 7 days. An aliquot of formaldehyde solution, 37%, was added to each 20 liter bottle to achieve a concentration of 0.4%. The pH of the mixtures was adjusted to 7.4 to 7.6. The bottles were incubated at 34.5 to 36.5°C for 7 days on a shaker. An aliquot of formaldehyde solution, 37%, was added to each 20 liter bottle to achieve a concentration of 0.5%. The pH of the mixtures was adjusted to 7.4 to 7.6. The bottles were incubated at 34.5 to 36.5°C for 8 weeks. The crude toxoid was tested for detoxification. The bottles were stored at 1 to 5°C during the testing period.

18

Purification of the crude diphtheria toxoid protein

[0057] The crude toxoid was allowed to warm to room temperature, and the contents of the 20-liter bottles were combined into a purification tank. The pH of the toxoid was adjusted to 7.2 to 7.4, and charcoal was added to the crude toxoid and mixed for 2 minutes. The charcoal toxoid mixture was allowed to stand for 1 hours, and was then filtered through a depth filter cartridge into a second purification tank. Solid ammonium sulfate was added to the filtrate to achieve 70% of saturation. The pH was adjusted to 6.8 to 7.2, and the solution was allowed to stand for 16 hours. The precipitated protein was collected by filtration and washed with 70% of saturation ammonium sulfate solution, pH 7.0. The precipitate was dissolved into sterile distilled water, and the protein solution was filtered into a stainless steel collection vessel. The pH was adjusted to 6.8 to 7.2, and ammonium sulfate was added to 40% of saturation. The pH of the solution was adjusted to 7.0 to 7.2, and the solution was allowed to stand for 16 hours. The precipitate was removed by filtration and discarded. Ammonium sulfate was added to the filtrate to 60% of saturation, and the pH adjusted to 7.0 to 7.2. The mixture was allowed to stand for 16 hours, and the precipitated protein was collected by filtration. The precipitate was dissolved into sterile distilled water, filtered to remove undissolved protein, and diafiltered against 0.85% physiological saline.

Concentration and sterile filtration of the purified diphtheria toxoid protein

[0058] The protein solution was concentrated to 15g per liter and diafiltered against 10 volumes of 0.85% physiological saline using a 10,000 MWCO regenerated cellulose filter cartridge. The concentrated protein solution was sterilized by filtration through a 0.2 micron membrane. The protein solution was stored at 1 to 5°C until processed onto conjugate.

[0059] The protein concentration was determined by the method of Lowry, O.H. et al (1951) Journal of Biological Chemistry 193, p265-275. The purity of the protein was measured by sterility, LAL (endotoxin) content, and residual formaldehyde content.

Example 5***Preparation of monovalent Conjugates of *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W-135, and Y polysaccharide to diphtheria toxoid protein***

[0060] Materials used in this preparation include adipic acid derivatized polysaccharide from *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W-135, and Y (prepared in accordance with Example 3), sterile diphtheria toxoid protein (prepared in accordance with Example 4), EDAC, ammonium sulfate, sterile 1N hydrochloric acid, sterile 1N sodium hydroxide, and sterile physiological saline (0.85%).

19

[0061] Each serogroup polysaccharide conjugate was prepared by a separate reaction. All four conjugates were prepared by the following process. A stainless steel tank was charged with the purified adipic acid derivatized polysaccharide at a reaction concentration of 700 to 1000 μ moles of reactive hydrazide per liter and purified diphtheria toxoid protein at a reaction concentration of 3.8 to 4.0g protein per liter. Physiological saline 0.85%, was used to dilute the starting materials to the target reaction concentrations and the pH was adjusted to 5.0 ± 0.1 . An aliquot of EDAC was added to the polysaccharide protein mixture to achieve a reaction concentration of 2.28 to 2.4g per liter. The pH of the reaction was kept at 5.0 ± 0.1 for 2 hours at 15 to 30°C. After two hours, the pH was adjusted to 7.0 ± 0.1 using sterile 1N sodium hydroxide, and the reaction was stored at 1 to 5°C for 16 to 20 hours.

[0062] The reaction mixture was allowed to warm to 15 to 30°C and the reaction vessel was connected to an ultrafiltration unit equipped with a 30,000 MWCO regenerated cellulose cartridge. Solid ammonium sulfate was added to 60% of saturation (for serogroups A, W-135 and Y) and 50% of saturation (for serogroup C). The conjugate reaction mixture was diafiltered against 20 volumes of 60% of saturated ammonium sulfate solution (for serogroups A, W-135 and Y) and 50% of saturated ammonium sulfate solution (for serogroup C), followed by 20 volumes of physiological saline, 0.85%. The diafiltered conjugate was first filtered through a filter capsule containing a 1.2 micron and a 0.45 micron filter, and then through a second filter capsule containing a 0.22 micron filter.

[0063] The quantity of polysaccharide and O-acetyl content were measured by the same methods used on the depolymerized and derivatized polysaccharide. The quantity of protein was determined by the Lowry method. The molecular size of the conjugate was determined by passage through a gel filtration chromatography column sold under the tradename "TSK6000PW" that used DNA as the void volume marker, ATP as the total volume marker, and bovine thyroglobulin as a reference marker. In addition, the molecular size of the conjugate eluted from the TSK6000PW column was measured by multi-angle laser light scattering. The antigenic character of the conjugate was measured by binding to anti-polysaccharide serogroup specific antibody using double-sandwich ELISA method. The purity of the conjugates was determined by measuring the amount of unbound (unconjugated) polysaccharide by elution through a hydrophobic interaction chromatography column, unconjugated protein by capillary electrophoresis, sterility, LAL (endotoxin) content, residual EDAC content, and residual ammonium ion content.

Example 6**Formulation of a multivalent meningococcal
A, C, W-135, and Y polysaccharide diphtheria toxoid conjugate vaccine**

[0064] Materials used in this preparation include, serogroups A, C, W-135, and Y polysaccharide-diphtheria toxoid conjugates (prepared in accordance with Example 5), sterile 100mM sodium phosphate buffered physiological saline (0.85% sodium chloride).

[0065] An aliquot of sterile 100-500mM sodium phosphate buffered physiological saline was added to physiological saline (0.85%) in a stainless steel bulking tank to yield a final vaccine concentration of 10mM sodium phosphate. An aliquot of each of from two to four of the sterile monovalent meningococcal polysaccharide-diphtheria toxoid conjugates was added to the bulking tank containing 10mM sterile sodium phosphate physiological saline to yield a final concentration of 8µg of each serogroup polysaccharide per milliliter of buffer. The formulated tetravalent conjugate was mixed and filtered through a 0.2µm filter into a second bulking tank.

[0066] The quantity of each serogroup polysaccharide present in the multivalent formulation was determined by component saccharide analysis using high pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. The quantity of protein was measured by the method of Lowry. The pH of the vaccine was measured using a combination electrode connected to a pH meter. The antigenic character of the multivalent conjugate vaccine was measured by binding to anti-polysaccharide serogroup specific antibody using a double-sandwich ELISA method. Immunogenicity of the multivalent conjugate vaccine was measured the ability of each conjugate present in the vaccine to elicit both a primary and booster anti-polysaccharide IgG immune response in an animal model. The purity of the multivalent conjugate vaccine was determined by measuring the amount of unbound (unconjugated) polysaccharide using high pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, sterility, LAL (endotoxin) content, pyrogenic content, and general safety.

Example 7**Preparation of aluminum-hydroxide adjuvanted multivalent
meningococcal polysaccharide diphtheria toxoid protein conjugate**

[0067] Preparation of conjugate adsorbed to aluminum hydroxide. Materials used in this preparation include serogroups A, C, W-135, and Y polysaccharide-diphtheria toxoid conjugates preparation described in Example 5, sterile physiological saline (0.85% sodium chloride), and sterile aluminum hydroxide in physiological saline (0.85% sodium chloride).

[0068] An aliquot of each of the sterile monovalent meningococcal polysaccharide diphtheria toxoid conjugates was added to the bulking tank containing physiological saline to yield a final concentration of 8µg of each serogroup polysaccharide per milliliter of buffer. An aliquot of sterile aluminum hydroxide in physiological saline (0.85% sodium chloride) was added to the multivalent conjugate vaccine to achieve a final concentration of 0.44mg aluminum ion per milliliter vaccine.

Example 8

Preparation of aluminum phosphate-adjuvanted conjugate

[0069] Materials used in this preparation include serogroups A, C, W-135, and Y polysaccharide-diphtheria toxoid conjugates preparation described in Example 5, sterile physiological saline (0.85% sodium chloride), and sterile aluminum phosphate in physiological saline (0.85% sodium chloride).

[0070] An aliquot of each of the sterile monovalent meningococcal polysaccharide-diphtheria toxoid conjugates was added to the bulking tank containing physiological saline to yield a final concentration of 8µg of each serogroup polysaccharide per milliliter of buffer. An aliquot of sterile aluminum phosphate in physiological saline (0.85% sodium chloride) was added to the multivalent conjugate vaccine to achieve a final concentration of 0.44mg aluminum ion per milliliter vaccine.

Example 9

Immunogenicity of the tetravalent conjugate vaccine

[0071] The tetravalent conjugate vaccine was studied for its ability to elicit an immune response in small laboratory animals prior to evaluation in the clinic. Mice, rats and rabbits have been used to study the immunogenicity of conjugate vaccines relative to the polysaccharide vaccines. These animal models are useful, because they are capable of distinguishing the conjugate vaccine from the corresponding polysaccharide by their immune response pattern. The conjugate vaccine elicits a T-dependent-like immune response in these models, whereas the polysaccharide vaccine elicits a T-independent-like immune response.

[0072] In the mouse immunogenicity studies, the conjugate was diluted with physiological saline (0.85% sodium chloride) to administer between one-quarter to one-sixteenth of a human dose. The mice were administered one or two doses of vaccine, either conjugate or polysaccharide, and blood specimens were taken two weeks post vaccination. One group of mice served as an unimmunized control group. Antibodies to each of the serogroup polysaccharides were

measured by an ELISA method. The serum samples were incubated with excess of each capsular polysaccharide that was bound to a ELISA microtiter plate well. Methylated human serum albumin was used to bind each serogroup polysaccharide to the microtiter well. Following incubation the microtiter well was washed with buffer, and a secondary antibody-enzyme conjugate was added to the antibody-polysaccharide complex which binds to the anti-meningococcal polysaccharide antibody. The microtiter plate was washed, and a chemical substrate was added to the polysaccharide-meningococcal antibody-secondary antibody-enzyme conjugate. The enzyme hydrolyzes a portion of the chemical substrate that results in color formation. The amount of color formation is proportional to the amount of polysaccharide-meningococcal antibody-secondary antibody-enzyme conjugate that is bound to the microtiter well. The potency of the vaccine was determined by comparison to reference antisera for each serogroup, which is measured in the same microtiter plate, by a parallel line calculation using a four-parameter fit. The mouse reference antisera was generated in the same strain of mice that were individually immunized with three doses of each serogroup conjugate vaccine. The mouse reference antisera were assigned titers based on the inverse of dilution yielding an optical density of 1.0.

[0073] Presented in Table 1 is a summary of anti-polysaccharide IgG titers for each serogroup achieved in Swiss-Webster mice who were vaccinated with two doses of either the tetravalent conjugate vaccine, both liquid and aluminum hydroxide formulation, or the corresponding tetra-valent polysaccharide vaccine. The IgG titers were measured on pooled sera from a set of ten mice. Two sets of 10 mice were used to measure the immune response to each vaccine formulation. Both sets were vaccinated on day 1. On day 15 (2 weeks post vaccination) blood specimens were taken from one set of 10 mice, and the second set of ten mice were vaccinated with a second dose of vaccine on day 15. Two weeks later on day 29, blood specimens were taken from the second set of 10 mice, and from the unimmunized control group. All antibodies were titrated at the same time, that is, both the day 15 and day 29 blood specimens were assayed at the same time along with the unimmunized controls and the mouse reference sera.

Table 1
Anti-polysaccharide IgG titers on pooled sera from Swiss-Webster mice vaccinated with either tetravalent conjugate or polysaccharide.

Vaccine Group	Dose- age µg ps	Anti-Men A		Anti-Men C		Anti-Men W135		Anti-Men Y	
		D15	D29	D15	D29	D15	D29	D15	D29
Conjugate (no adjuvant)	0.25	131	2640	250	1510	1350	6100	5660	4830

Vaccine Group	Dosage $\mu\text{g ps}$	Anti-Men A		Anti-Men C		Anti-Men W135		Anti-Men Y	
		D15	D29	D15	D29	D15	D29	D15	D29
Conjugate (no adjuvant)	0.50	171	6220	416	2050	849	26000	5980	112000
Conjugate (no adjuvant)	1.0	249	4500	525	2740	1450	16600	11300	59100
Conjugate (Alum. Hyd.)	0.25	2920	4500	1010	2980	2300	33700	11600	124000
Conjugate (Alum. Hyd.)	0.50	5800	9550	2280	1010	4810	71900	26400	330000
Conjugate (Alum. Hyd.)	1.0	6210	9350	2630	12800	7870	94000	32700	302000
Polysaccharide (no adjuvant)	1.0	136	173	184	205	612	608	4470	3910
Unimmunized	n.a.	—	110	—	145	—	623	—	777

[0074] The tetravalent conjugate vaccine, both unadjuvanted and adjuvanted with aluminum hydroxide, is capable of eliciting a strong anti-polysaccharide IgG immune response in this mouse model. The aluminum hydroxide adjuvant serves to improve both the primary and booster response to each of the four serogroup polysaccharide conjugates. The tetravalent polysaccharide vaccine elicits a negligible immune response to serogroups A, C, and W135 in this mouse model relative to the unimmunized control, whereas serogroup Y does elicit a respectable immune response, but not a booster response. The tetravalent polysaccharide vaccine fails to elicit a booster response to all four serogroup polysaccharides in this model. This model can readily differentiate between the polysaccharide vaccine and the conjugate vaccine both by the magnitude of the immune response and booster response pattern to each of the serogroup conjugate vaccines.

[0075] The unadjuvanted form of the tetravalent conjugate vaccine has been studied in the clinic for safety and immunogenicity in young healthy adults and in young healthy children. In the adult study, subjects were vaccinated with a single dose of vaccine, formulated to contain 4 μg of each of the four conjugates, as polysaccharide. Blood specimens were taken immediately prior to vaccination and 28-days post vaccination. Antibodies to each of the serogroup conjugates were measured by an ELISA measurement that quantified the amount of anti-polysaccharide IgG. The ELISA method is very similar to the method used to measure the amount of IgG antibody present in mouse sera.

[0076] Briefly, the serum samples were incubated in ELISA microtiter wells that were coated with excess meningococcal polysaccharide that was bound to the plate with methylated human

serum albumin. The amount of bound antibody was determined by a reaction with peroxidase-labeled mouse anti-human IgG specific monoclonal antibody. A subsequent reaction using peroxidase substrate generates a chromogenic product that was measured spectrophotometrically. The resulting optical density of the chromophore correlates with the amount of IgG antibody in the serum that is bound to the meningococcal polysaccharide on the microtiter plate. The amount of antibody was calculated by comparison to a human reference sera (CDC 1922) with an assigned value using a 4-parameter logistic curve method. In addition, the antibodies were measured for their ability to lyse serogroup specific bacteria. The serum samples are first heat-inactivated to destroy complement. The serum samples are diluted by two-fold dilutions in a sterile 96-well microtiter plate. Serogroup specific bacteria along with baby rabbit complement were added to the serum dilutions and allowed to incubate. After an incubation period, an agar overlay medium was added to the serum/complement/bacteria mixture. The agar overlay was allowed to harden, and then incubated overnight at 37°C with 5% carbon dioxide. The next day, bacterial colonies present in the wells were counted. The endpoint titer was determined by the reciprocal serum dilution yielding greater than 50% killing as compared to the mean of the complement control wells.

[0077] Presented in Table 2 is a summary of the anti-polysaccharide mean IgG concentrations for each serogroup and the mean serum bactericidal antibody (SBA) titer in adult sera pre and post vaccination with the tetravalent conjugate vaccine formulated at 4µg polysaccharide per dose. The immune response to all four serogroup conjugates were satisfactory, that is comparable to the immune response achieved by the licensed polysaccharide vaccine in terms of both IgG antibody and functional bactericidal antibody responses. The vaccine was found to be safe for this age group and the safety profile was found to be similar to that of the licensed polysaccharide vaccine.

Table 2

Anti-polysaccharide IgG GMC (group mean concentration and Serum Bactericidal Antibody GMTs (group mean titers) for young health adults vaccinated with a tetravalent meningococcal conjugate vaccine formulated at 4µg per dose by polysaccharide.

Immune Re- sponse by Serogroup	N _{pre} /N _{post}	IgG GMC (µg/ml) [95% CI]		SBA GMT [95%CI]	
		Pre	Post	Pre	Post
A	28/28	3.3 [2.3-4.8]	38.4 [22.2-66.4]	487 [231-1027]	6720 [4666-15428]
C	28/28	0.4 [0.2-0.7]	5.5 [3.0-10.1]	16.4 [7.1-37.7]	1560 [800-4042]
W-135	28/28	0.6 [0.3-1.0]	5.8 [2.9-11.7]	10.0 [5.9-16.9]	609 [250-1481]

Immune sponse by Serogroup	Re- N _{pre} /N _{post}	IgG GMC (µg/ml) [95% CI]		SBA GMT [95%CI]	
		Pre	Post	Pre	Post
Y	28/28	1.3 [0.7-2.5]	6.8 [3.2-14.6]	19.0 [8.0-41.2]	390 [143-1061]

[0078] In younger age groups, children less than 2 years of age, the immune response to the polysaccharide vaccine is weak and the immunity has been estimated to wane after one year. Children 12 to 15 months of age were administered a single dose of tetravalent conjugate vaccine formulated at 4µg of each serogroup polysaccharide per dose, and they were administered a second dose of tetravalent conjugate vaccine two months following the first dose. Blood specimens were taken prior to the first and second vaccination, and one month post the second vaccination. The antibody responses to the four serogroup conjugates are summarized in Table 3. For each serogroup a booster response for IgG antibody and for functional-bactericidal antibody was observed following a second dose of tetravalent conjugate. The level of IgG antibody elicited by the conjugate vaccine is comparable to that elicited by the licensed polysaccharide for this age group; a post 6 week response of 3.64µg/ml (2.96-4.49) IgG antibody response to serogroup C polysaccharide. However, the level of bactericidal antibody elicited by the conjugate vaccine is much higher than what is normally elicited by the licensed polysaccharide vaccine for this age group; a post 6 week SBA titer of 7.2 (5.0-10.4). The reason for this discordance between IgG antibody and bactericidal antibody in the younger populations is thought to result from the polysaccharide eliciting a high proportion of low avidity antibody in the younger populations. Conversely, the conjugate appears to elicit a much higher proportion of high avidity antibody. High avidity antibody is thought to be responsible for the bactericidal activity.

Table 3

Anti-polysaccharide IgG GMC (group mean concentration) and Serum Bactericidal Antibody GMTs (group mean titers) for young healthy children (1 to 2 years of age) vaccinated with two doses of tetravalent meningococcal conjugate vaccine formulated at 4µg per dose by polysaccharide

Immune Response By Sero- group	N ₁ /N ₂ /N ₃	IgG GMC (µg/ml) [95% CI]			SBA GMT [95% CI]		
		Pre dose 1	Pre dose 2	Post dose 2	Pre dose 1	Pre dose 2	Post dose 2
A	8/8/8	0.2 [0.1-0.4]	2.1 [0.9-4.8]	4.4 [2.1-9.1]	8.7 [1.4-55.1]	1328 [179-9871]	3158 [1857-5371]

26

C	8/8/8	0.2 [0.0-0.7]	1.0 [0.3-3.1]	1.5 [0.6-3.6]	6.7 [2.0-23.0]	117 [37.7-365]	304 [128-721]
W-135	8/8/8	0.1 [0.1-0.2]	0.6 [0.2-1.9]	1.5 [0.8-3.1]	6.2 [2.2-17.2]	22.6 [2.8-185]	430 [172-1076]
Y	8/8/8	0.3 [0.2-0.4]	1.2 [0.5-2.8]	4.5 [2.7-7.6]	5.7 [3.7-8.8]	98.7 [20.4-478]	304 [101-920]

[0079] In addition to the ability of the tetravalent conjugate vaccine to elicit a high functional antibody response in younger populations compared to the licensed polysaccharide vaccine, the tetravalent conjugate vaccine is capable of eliciting an anamnestic response, demonstrating that protection elicited by the tetravalent conjugate vaccine of the present invention is long-lived. In the development of the tetravalent conjugate vaccine, studies were first conducted on a bivalent AC conjugate formulation. The vaccine offers wider coverage than the current licensed monovalent C conjugate, but does not protect against disease caused by serogroups W135 and Y.

[0080] A clinical study was performed with infant subjects that compared the immune response to the bivalent AC polysaccharide vaccine versus the bivalent AC conjugate vaccine. In this study, a third group of infants were enrolled to serve as a control group and they received a *Haemophilus influenzae* type b conjugate. All three vaccine groups receive the same pediatric vaccines. The bivalent AC conjugate group received three doses of conjugate vaccine (4µg polysaccharide per dose) at 6, 10, and 14 weeks of age. The bivalent AC polysaccharide group received two doses of a bivalent AC polysaccharide vaccine (50µg polysaccharide per dose) at 10 and 14 weeks of age. The *Haemophilus influenzae* type b conjugate group received three doses of conjugate vaccine at 6, 10, and 14 weeks of age. Blood specimens were taken at 6 weeks, pre-vaccination, and at 18 weeks, 4 weeks post vaccination. When the children were 11 to 12 months of age, blood specimens were taken and the children who had received either the bivalent AC conjugate or the bivalent AC polysaccharide vaccine received a booster dose of AC polysaccharide. The reason for the booster dose of polysaccharide was to evaluate whether or not the subjects would elicit an anamnestic response.

[0081] The results of this study, both the primary and polysaccharide booster immune responses are presented in Table 4 for the IgG antibody response and Table 5 for the SBA antibody response. The IgG antibody response post primary series was approximately the same for both the polysaccharide and conjugate vaccine. However, the bactericidal antibody response in the conjugate vaccinated subjects was much higher than that for the polysaccharide vaccinated sub-

jects. As observed with the one year old subjects, vaccination of infants with the polysaccharide elicits very little functional-bactericidal antibody. The antibody elicited by the infants to the polysaccharide vaccine is presumably low avidity antibody, whereas, the conjugate vaccine appears to elicit high avidity antibody, thereby accounting for the much higher titer of bactericidal antibody. The high level of functional antibody elicited by the booster dose of polysaccharide vaccine in the subjects who had received the conjugate vaccine in the primary vaccination series, indicates that these subjects have been primed for a memory or T-cell dependent antibody response. The subjects who received the polysaccharide vaccine in the primary vaccination series elicited a modest response to the polysaccharide booster dose, that is indicative of a T-cell independent response.

Table 4

Anti-polysaccharide IgG GMC (group mean concentration) in infants against serogroups A and C before and after both the primary series immunization (6, 10 and 14 weeks of age) and the booster vaccination with bivalent AC polysaccharide given at 11 to 12 months of age.

Immune Response Vaccine Group	Re-by	Primary Vaccination GMC [95% CI]			PS Booster Vaccination GMC [95% CI]		
		N	Pre	Post	N	Pre	Post
Serogroup A:							
AC Conjugate		34	3.4 [2.2-5.4]	5.8 [4.3-8.0]	31	0.2 [0.1-0.3]	7.0 [4.0-12.0]
AC Polysaccharide		35	3.0 [1.7-5.3]	5.5 [4.1-7.3]	30	0.9 [0.5-1.4]	3.1 [2.0-4.7]
HIB Conjugate		36	3.2 [2.2-4.5]	0.6 [0.4-0.8]	NA	NA	NA
Serogroup C:							
AC Conjugate		31	1.6 [0.9-2.8]	2.8 [2.0-3.9]	31	0.1 [0.1-0.2]	8.1 [4.5-14.5]
AC Polysaccharide		35	2.3 [1.4-3.9]	5.3 [3.8-7.4]	30	0.6 [0.3-1.0]	2.8 [1.7-4.7]
HIB Conjugate		36	2.0 [1.2-3.5]	0.5 [0.3-0.7]	NA	NA	NA

Table 5

SBA antibody GMT (group mean titer) in infants against serogroups A and C before and after both the primary series immunization (6, 10 and 14 weeks of age) and booster vaccination with bivalent AC polysaccharide given at 11 to 12 months of age.

28

Immune Response Vaccine Group	Re-By	Primary Vaccination GMT [95% CI]			PS Booster Vaccination GMT [95% CI]		
		N	Pre	Post	N	Pre	Post
Serogroup A:							
AC Conjugate		34	11.8 [7.2-19.3]	177 [101-312]	24	10.1 [5.6-18.0]	373 [162-853]
AC Polysaccharide		32	14.7 [8.5-25.4]	7.0 [4.7-10.5]	26	6.1 [3.9-9.5]	24.1 [11-53]
HIB Conjugate		35	11.2 [6.8-18.3]	6.7 [4.3-10.5]	NA	NA	NA
Serogroup C:							
AC Conjugate		34	50.8 [24-107]	189 [128-278]	27	4.6 [3.6-5.6]	287 [96.2-858]
AC Polysaccharide		32	62.7 [29-131]	25.4 [14.4-44.6]	26	4.1 [3.9-4.3]	14.4 [7.9-26.1]
HIB Conjugate		36	45.3 [21.9-133]	7.3 [4.7-11.3]	NA	NA	NA

[0082] In addition to the benefits that this invention offers to the improved protection against meningococcal disease in young populations and the wider protection against serogroups A, C, W-135 and Y, the tetravalent conjugate may provide protection to other pathogens by inducing an antibody response to the carrier protein. When the tetravalent conjugate vaccine, using diphtheria toxoid conjugate, was administered to infants, these subjects also received the routine pediatric immunizations, which included diphtheria toxoid. Therefore, in these subjects there was no apparent improvement in the antibody response to diphtheria toxoid. However, when the diphtheria toxoid conjugate was administered to subjects that did not receive concomitant diphtheria toxoid containing vaccines, a strong booster response to diphtheria toxoid was observed. These subjects had received a three dose regimen of DTP at 2, 3, and 4 months of age. In this study, the subjects received either single dose of a bivalent AC conjugate or a single dose of bivalent AC polysaccharide vaccine between 2 and 3 year of age. Blood specimens were taken at the time of vaccination and 30-days post vaccination. The bivalent AC conjugate used diphtheria toxoid as the carrier protein.

[0083] The immune response of diphtheria toxoid in the two vaccine groups is presented in Table 6. The polysaccharide did not serve to stimulate an anti-diphtheria immune response in these subjects as expected, however a strong anti-diphtheria immune response was observed for the subjects receiving the AC conjugate. Therefore, the meningococcal conjugate vaccine may provide an added benefit of stimulating an immune response to carrier protein thereby providing protection against diseases caused by *Corynebacteria diphtheriae* when diphtheria toxoid is used as a carrier protein.

Table 6

*Anti-diphtheria antibody by ELISA GMT (group mean titer) in IU/ml
in young healthy children vaccinated with either a bivalent AC diphtheria
toxoid conjugate vaccine formulated at 4µg as polysaccharide per dose
or a bivalent AC polysaccharide vaccine formulated at 50µg as
polysaccharide per dose*

Immune Response by Vaccine Group	N _{pre} /N _{post}	Anti-Diphtheria Antibody (ELISA – IU/ml) [95%CI]	
		Pre	Post
AC Conjugate	104/103	0.047 [0.036 – 0.060]	21.2 [11.6 – 38.6]
AC Polysaccharide	103/102	0.059 [0.045 – 0.076]	0.059 [0.045 – 0.077]

References:

- [0084] Frasch, C.E., Zollinger, W.D. and Poolman, J.T. (1985) Review of Infectious Diseases 7, pp. 504-510.
- [0085] Reido, F.X., Plikaytis, B.D. and Broome, C. V. (1995) Pediatric Infectious Disease Journal 14, pp.643-657.
- [0086] Artenstein, M.S., Gold, R., Zimmerly, J.G., Wyle, F.A., Schneider, H. and Harkins, C. (1970) The New England Journal of Medicine 282, pp. 417-420.
- [0087] Peltola, H., Mäkelä, H., Käyhty, H., Jousimies, H., Herva, E., Hällström, K., Sivonen, A., Renkonen, O.V., Pettay, O., Karanko, V., Ahvonen, P., and Sarna, S. (1997) The New England Journal of Medicine 297, pp. 686-691.
- [0088] Reingold, A.L., Broome, C.V., Hightower, A.W., Ajello, G.W., Bolan, G.A., Adamsbaum, C., Jones, E.E., Phillips, C., Tiendrebeogo, H., and Yada, A. (1985) The Lancet 2, pp. 114-118.
- [0089] Goldschneider, I., Lepow, M.L., Gotschlich, E.C., Mauck, F.T., Bachl, F., and Randolph, M. (1973) The Journal of Infectious Diseases 128, pp. 769-776.
- [0090] Gold, R., Lepow, M.L., Goldschneider, I., and Gotschlich, E.C. (1977) The Journal of Infectious Diseases 136, S31-S35.
- [0091] Brandt, B.L. and Artenstein, M.S. (1975) The Journal of Infectious Diseases 131, pp. S69-S72.
- [0092] Käyhty, H., Karanko, V., Peltola, H., Sarna, S., and Mäkelä, H. (1980) The Journal of Infectious Diseases 142, pp. 861-868.
- [0093] Cessey, S.J., Allen, S.J., Menon, A., Todd, J.E., Cham, K., Carlone, G.M., Turner, S.H., Gheesling, L.L., DeWitt, W., Plikaytis, B.D., and Greenwood, B. (1993) The Journal of Infectious Diseases 167, pp 1212-1216.

- [0094] Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, G.L., Tramont, E.C., Kasper, D.L., Altieri, P.L., Berman, S.L., and Lowenthal, J.P. (1972) *The Journal of Infectious Diseases*, 126, pp. 514-522.
- [0095] Jennings, H.J. and Lugowski, C. (1981) *The Journal of Immunology* 127, pp. 1011-1018.

I claim:

1. An immunological composition comprising two, three, or four distinct protein-polysaccharide conjugates, wherein each of the conjugates comprises a capsular polysaccharide from two or more serogroup of *N. meningitidis* conjugated to one or more a carrier protein(s).
2. The immunological composition of claim 1, wherein the capsular polysaccharides are selected from the group consisting of capsular polysaccharides from serogroups A, C, W-135 and Y of *N. meningitidis*
3. The immunological composition of claim 1, wherein the capsular polysaccharides are from serogroups A and C of *N. meningitidis*.
4. The immunological composition of claim 1, wherein the capsular polysaccharides are from serogroups A, C, W-135 and Y of *N. meningitidis*.
5. The immunological composition of claim 1, wherein the carrier protein is diphtheria toxoid.
6. The immunological composition of claim 1, further comprising an adjuvant.
7. The immunological composition of claim 5, wherein the adjuvant is aluminum hydroxide.
8. The immunological composition of claim 5, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.
9. A method of inducing an immunological response to capsular polysaccharide of *N. meningitidis* comprising administering an immunologically effective amount of the immunological composition of claim 1 to a human or animal.
10. A multivalent meningococcal vaccine comprised of immunologically effective amounts of from two to four distinct protein-polysaccharide conjugates, wherein each of the conjugates contains a different capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, and wherein each capsular polysaccharide is selected from the group consisting of capsular polysaccharide from serogroups A, C, W-135 and Y.

32

11. The multivalent meningococcal vaccine of claim 9, wherein the capsular polysaccharides are prepared from serogroups A and C of *N. meningitidis*.
12. The multivalent meningococcal vaccine of claim 9, wherein the capsular polysaccharides are prepared from serogroups A, C, W-135 and Y of *N. meningitidis*.
13. The multivalent meningococcal vaccine of claim 9, wherein the carrier protein is diphtheria toxoid.
14. The multivalent meningococcal vaccine of claim 9, further comprising an adjuvant.
15. The multivalent meningococcal vaccine of claim 13, wherein the adjuvant is aluminum hydroxide.
16. the multivalent meningococcal vaccine of claim 13, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.
17. A method of protecting a human or animal susceptible to infection from *N. meningitidis* comprising administering to the human or animal an immunologically effective amount of the vaccine of claim 9.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:
**MCDONNELL BOEHLEN HULBERT
 & BERGHOFF**
 Attn. Greenfield, Michael S.
 300 South Wacker Drive
 Suite 3200
 Chicago, IL 60606
 UNITED STATES OF AMERICA

DOCKETED NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
 THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 OR THE DECLARATION

APR 10 2003

DUE DATE: 6/7/03 (PCT Rule 44.1)
 BY: AB/7/03

Date of mailing
 (day/month/year) 07/04/2003

Applicant's or agent's file reference
01-059-B

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US 02/ 01963

International filing date
 (day/month/year) 22/01/2002

Applicant
AVENTIS PASTEUR

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International Search Report has been established and is transmitted herewith.
 Filing of amendments and statement under Article 18:
 The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):
 When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.
 Where? Directly to the International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland
 Facsimile No.: (41-22) 740.14.35
 For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.
2. ☐ The applicant is hereby notified that no International Search Report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.
4. Further action(s): The applicant is reminded of the following:
 Shortly after 18 months from the priority date, the International application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the International application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for International publication.
 Within 18 months from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later).
 Within 30 months from the priority date, the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 18 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II.

Name and mailing address of the International Searching Authority
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL-2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.

Authorized officer
Sylvia Hermier

34

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 18. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 18

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 18 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 18, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 18 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 48.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 48.2).

Where a demand for international preliminary examination has been filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 18(1)" (see below, under "Statement under Article 18(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.



35

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added," or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 16 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 48.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/selected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/selected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 01-059-B	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmitted of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 02/ 01963	International filing date (day/month/year) 22/01/2002	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 23/01/2001
Applicant AVENTIS PASTEUR		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search 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.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box II. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 02/01963

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GIEBINK G S ET AL: "Pneumococcal capsular polysaccharide-meningococcal outer membrane protein complex conjugate vaccines: immunogenicity and efficacy in experimental pneumococcal otitis media." THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. UNITED STATES FEB 1993, vol. 167, no. 2, February 1993 (1993-02), pages 347-355, XP008015590 ISSN: 0022-1899 abstract	1,5-9,17
X	WO 98 45312 A (UNIV EMORY) 15 October 1998 (1998-10-15) page 5, line 7 - line 12; claims 13,14 page 21, line 24 - line 28; table 4 -/-	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 March 2003

Date of mailing of the international search report

07/04/2003

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.O. 5518 Patenkönig 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 02/01963

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAMPAGNE G. ET AL: "Safety and immunogenicity of three doses of a <i>Neisseria meningitidis</i> A + diphtheria conjugate vaccine in infants from Niger." PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL, (2000) 19/2 (144-150). , XP008015581 page 144, column 2, paragraph 4	1-17
A	PAOLETTI L C ET AL: "Neonatal mouse protection against infection with multiple group B streptococcal (GBS) serotypes by maternal immunization with a tetravalent GBS polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine." INFECTION AND IMMUNITY. UNITED STATES AUG 1994, vol. 62, no. 8, August 1994 (1994-08), pages 3236-3243, XP001148813 ISSN: 0019-9567 abstract	1-17



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 02/01963

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 9, 17 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 02/01963

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9845312	A	15-10-1998	US	6403306 B1	11-06-2002
			AU	6956198 A	30-10-1998
			WO	9845312 A1	15-10-1998

VACUNA MULTIVALENTE CONJUGADA DE POLISACARIDO

MENINGOCÓCICO-PROTEÍNA

Esta Solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense No. 60/263,435, presentada en enero 23. 2001.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el campo de la medicina en general, y más específicamente con la microbiología, inmunología, vacunas y la prevención de infecciones por un patógeno bacterial mediante inmunización.

RESUMEN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

La Neisseria meningitidis es un líder en la causa de la meningitis bacterial y la sepsis en todo el mundo. La incidencia de la enfermedad endémica meningocócica durante los últimos 30 años está entre 1 a 5 por cada 100.000 en el mundo desarrollado, y entre 10 a 25, por

cada 100.000 en países en desarrollo (Reido, F.X., et. al. 1995). Durante epidemias la incidencia de la enfermedad meningocócica se acerca a 1000 por cada millón. Hay aproximadamente 2,600 casos de meningitis bacterial por año en los Estados Unidos, y en promedio 330.000 casos en países en desarrollo. El caso de fatalidad varía entre 10 a 20%.

La meningocócica patogénica está encerrada por una cápsula de polisacárido que se liga a la superficie de la membrana exterior del organismo. Trece serogrupos diferentes de meningococo de meningococo han sido identificados en la base de la especificidad inmunológica del polisacárido capsular (Frasch, C.E. et. al. 1985). De estos trece serogrupos, cinco causan la mayoría de las enfermedades meningocócicas; estos incluyen los serogrupos A, B, C, W135 y Y. El serogrupo A es responsable de la mayoría de la enfermedad epidémica. Los serogrupos B, C, y Y causan la mayoría de las enfermedades endémicas y brotes localizados.

La mucosa naso-orofaríngeal humana es el único reservorio natural conocido de la *Neisseria meningitidis*. La coloración tiene lugar tanto en la superficie

exterior de la célula mucosal y el tejido subepitelial de la nasofaringe. El portador del meningococo puede durar durante meses. El esparcimiento del meningococo ocurre por contacto directo o por gotas a través del aire. El meningococo se vuelve invasivo al pasar a través del epitelio mucosal por vía de las vacolas fagociticas como resultado de la endocitosis. Una defensa anfitriona del meningococo invasivo es dependiente de la bacteriolisis mediada por complemento. Los anticuerpos del cuerpo que son responsables de la bacteriolisis mediada por complemento están directamente en gran parte contra el polisacárido capsular exterior.

Las vacunas con base en el polisacárido meningococico han sido descritas las cuales fomentan una respuesta inmune contra el polisacárido capsular. Estos anticuerpos son capaces de bacteriolisis mediadas por complemento del serogrupo específico del meningococo. Las vacunas de polisacárido meningococico fueron mostradas como muy eficaces en niños y adultos (Peltola, H., et. al. 1977 y Artenstein, M.S. et.al. 1970), pero la eficacia fue limitada en infantes y niños muy jóvenes (Reingold, A.L. et.al. 1985). Dosis subsecuentes del polisacárido en poblaciones jóvenes fomentó una respuesta

débil y no amplificada (Goldschneider, I., et. al. 1973 y Gold, R., et. al. 1977). La duración de la protección fomentada por las vacunas de polisacarido meningococico no duró mucho, y se ha estimado que dura entre 3 a 5 años en adultos y niños por encima de 4 años de edad (Brandt, B., et. al. 1975, Käyhty, H., et. al. 1980, y Ceesay, S.J., et. al. 1993). Para niños de 1 a 4 años de edad la duración de la protección es menos de 3 años (Reindgold, A.L. et. al. 1985).

Los polisacáridos son incapaces de ligarse a la mayoría de las moléculas complejas de histocompatibilidad, un requisito para la presentación de antígenos frente y la estimulación de los linfocitos T ayudadores, i. e., ellos son los antígeno independientes de célula T. Los polisacáridos son capaces de estimular los linfocitos B para la producción de anticuerpos sin la ayuda de los linfocitos T ayudadores. Como resultado de la estimulación independiente T de los linfocitos B existe una carencia de inducción de memoria seguida de la inmunización por estos antígenos. Los antígenos de polisacárido son capaces de fomentar respuestas muy efectivas independientes T en adultos, pero estas

respuestas independientes T son débiles en el sistema inmune inmaduro de los pequeños y niños jóvenes.

Los antígenos de polisacáridos independientes T pueden convertirse a antígenos dependientes de T por el ligado covalente de los polisacáridos a moléculas de proteína ("portadores" o "proteínas portadoras"). Las células B que ligan el componente polisacárido de la vacuna conjugada pueden ser activadas por las células T ayudadoras específicas para péptidos que son una parte de la proteína portadora conjugada. La respuesta de los ayudadores T en la proteína portadora sirven para aumentar la producción de anticuerpos contra el polisacárido.

El polisacárido del serogrupo B ha sido mostrado que es pobre a no inmunogénico en la población humana (Wyle, F.A., et.al. 1972). Los enlaces químicos de este serogrupo de polisacárido a las proteínas no ha alterado significativamente la respuesta inmune en animales de laboratorio (Jennings, H.J., et. al. 1981). La razón de la carencia de una respuesta inmune de este serogrupo de polisacárido repiensa que surge de las similitudes estructurales entre el serogrupo B de polisacárido y las

glicoproteínas anfitrionas policlinalizadas, tal como las moléculas de adhesión de célula neural.

Una vacuna conjugada meningocócica con base en el serogrupo C polisacárido ha sido descrita. Esta vacuna monovalente fomenta una respuesta de anticuerpo funcional fuerte contra el polisacárido capsular presente en las cepas de *N. meningitidis* que corresponde al serogrupo C. Tal vacuna solo es capaz de proteger contra la enfermedad causada por la bacteria del serogrupo C.

Las vacunas existentes con base en el polisacárido meningocócico son de uso limitado en niños jóvenes y no suministran una protección duradera en adultos. La única vacuna meningocócica que se ha mostrado capaz de fomentar una protección larga en todos los grupos, incluyendo los niños en el riesgo para la infección meningocócica está basada en un polisacárido de un serogrupo único de *N. meningitidis* y no suministra protección contra la infección por otros serogrupos. Así, existe una necesidad de una vacuna conjugada meningocócica capaz de conferir una protección amplia, y duradera contra la enfermedad meningocócica en niños y adultos en riesgo de la infección meningocócica. Los polisacáridos multivalentes

meningococicos de la presente invención resuelven esta necesidad suministran formulaciones de vacuna en los cuales los polisacáridos inmunogénicos de la mayor parte de los serogrupos patogénicos de N. meningitidis han sido convertidos a antígenos dependientes de T por medio de conjugaciones con proteínas portadoras.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención suministra composiciones inmunológicas para el tratamiento de los conjugados de polisacárido meningocócico-proteína causados por la Neisseria meningitidis patogénica.

La presente invención suministra composiciones inmunológicas que comprenden dos o más conjugados de proteína-polisacárido, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular a partir de N-meningitidis conjugada con una proteína portadora.

La presente invención suministra composiciones inmunológicas que comprenden dos o más conjugados distintos de proteína-polisacárido, donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un

serogrupo diferente de *N. meningitidis* conjugado con una proteína portadora.

La presente invención suministra vacunas para los conjugados de polisacárido meningocócico-proteína causados por la *Neisseria meningitidis* patogénica. La presente invención suministra vacunas multivalentes meningocócicas que comprenden cantidades efectivas inmunológicamente de dos a cuatro conjugados de proteína-polisacáridos distintos, en donde cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado a una proteína portadora, y en donde cada uno de los polisacáridos capsulares se seleccionan del grupo que consiste del polisacárido capsular de los serogrupos A, C, W-135 y Y.

La presente invención también suministra métodos de fabricación de una composición de polisacárido multivalente meningocócico-proteína que comprende purificar dos o más polisacáridos capsulares a partir de la *Neisseria meningitidis* patogénica; conjugar los polisacáridos purificados con una o más proteínas portadoras y combinar los conjugados para hacer la

composición multivalente de polisacárido meningocócico-proteína.

La presente invención suministra adicionalmente un método para inducir una respuesta inmunológica al polisacárido capsular de la *N. meningitidis* que comprende administrar una cantidad inmunológicamente efectiva de la composición inmunológica de la invención a un humano o animal.

La presente invención suministra una vacuna multivalente meningocócica que comprende cantidades inmunológicamente efectivas de entre dos a cuatro conjugados de proteína-polisacárido, en donde cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado con una proteína portadora, y en donde cada polisacárido capsular es seleccionado del grupo que consiste de polisacárido capsular de los serogrupos A, C, W-135 y Y.

La presente invención suministra un método de protección a un humano o animal susceptible de la infección de *N. meningitidis* que comprende administrar

una dosis inmunológicamente efectiva de la vacuna de la invención al humano o animal.

Todas las patentes, solicitudes de patente, y otras publicaciones mencionadas aquí son incorporadas como referencia en su totalidad.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención comprende una composición inmunológica de dos o más conjugados de proteína-polisacárido distintos, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular conjugado con una proteína portadora. Así, la presente invención incluye composiciones que comprenden dos o más conjugados de polisacáridos capsulares diferentes con una o más proteínas portadoras.

Los polisacáridos capsulares pueden ser preparados por técnicas estándar conocidas por aquellos versados en la materia (ref). En la presente invención los polisacáridos capsulares preparados a partir de serogrupos A, C, W-135 y Y de *N. meningitidis* son los preferidos.

En una modalidad preferida, estos conjugados de serogrupo meningocócico son preparados por procesos separados y formulados en una formulación de dosificación única. Por ejemplo, los polisacáridos capsulares de serogrupos A, C, W-135 y Y de *N. meningitidis* son purificados separadamente.

En una modalidad preferida de la invención el polisacárido purificado es despolimerizado y activado antes de la conjugación con una proteína portadora. En una modalidad preferida de la presente invención los polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W-135, y Y de la *N. meningitidis* son despolimerizados parcialmente usando condiciones oxidativas suaves.

La despolimerización o despolimerización parcial de los polisacáridos pueden ser seguidas por una etapa de activación. Por "activación" se quiere decir un tratamiento químico del polisacárido para suministrar grupos químicos capaces de reaccionar con la proteína portadora. Un método de activación preferido involucra el tratamiento con dihidrazida de ácido adípico en salina fisiológica con pH 5,0±1 durante aproximadamente 2 horas

entre 15 a 30°C. Un proceso para la activación se describe en la patente estadounidense 5,965,714,

Una vez activados, los polisacáridos capsulares pueden entonces ser conjugados con una o más proteínas potadoras. En una modalidad preferida de la presente invención cada polisacárido capsular se conjuga separadamente con una especie de proteína portadora única. En una modalidad preferida los polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W-135 y Y de la N. meningitidis son cada uno conjugados separadamente con las mismas especies de proteína portadora.

Las proteínas portadoras pueden incluir toxinas bacteriales inactivadas tales como el toxoide de difteria, CRM197, el toxoide de tétanos, toxoide de pertussis, el Ecolí LT, E. coli ST, y la exotoxina A de la Pseudomonas aeruginosa. Las proteínas de membrana exterior bacteriana tales como los complejos C de membrana exterior (OMPC), las porinas, las proteínas de ligando de transferrina, neumolisis, las proteínas A de superficie neumococal (PspA), o las proteínas de adhesina neumococal (PsaA) pueden también ser usadas. Otras proteínas, tales como ovalbumina, hemocianina limpita de clave de agujero

(KLH), la albúmina de suero bovino (BSA) o la proteína purificada derivativa de tuberculina (PPD) también pueden ser usadas como proteínas portadoras. Las proteínas portadoras son proteínas preferiblemente que ni son tóxicas y no reactogénicas y obtenibles en cantidades suficientes y pureza. Las proteínas portadoras deben ser llevables a procedimientos de conjugación estándares. En una modalidad preferida de la presente invención la toxina de difteria purificada a partir de cultivos de *Corynebacterium diphtheriae* y las detoxificadas químicamente usando formaldehído son usadas como proteínas portadoras.

Después de la conjugación del polisacárido capsular con la proteína portadora, los conjugados polisacárido-proteína pueden ser purificados (enriquecidos con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) por una variedad de técnicas. Un objetivo de la etapa de purificación es remover el polisacárido no ligado del conjugado polisacárido-proteína. Un método para la purificación, involucra la ultrafiltración en la presencia de sulfato de amonio, se describe en la patente estadounidense 6,146,902. Alternativamente, los conjugados pueden ser purificados a partir de una

proteína que no ha reaccionado y el polisacárido por un número de técnicas estándar y que incluyen, Inter. alia, la cromatografía de exclusión de tamaño, la centrifugación de gradiente de densidad, la cromatografía por interacción hidrofóbica o la fraccionación por sulfato de amonio. Ver, por ejemplo, P.W.Anderson, et.al.(1986). J.Immunol.137:1181-1186. Ver también H.J. Jennings y C.Lugowski (1981) J, Immunol.127:1011-1018.

Después de la conjugación del polisacárido y la proteína portadora las composiciones inmunológicas de la presente invención son hechas combinando los diferentes conjugados de polisacárido-proteína. Las composiciones inmunológicas de la presente invención comprenden dos o más polisacáridos capsulares diferentes conjugados con una o más proteínas. Una modalidad preferida de la presente invención es una composición inmunológica bivalente que comprende polisacáridos capsulares de los serogrupos A y C de N. meningitidis conjugados separadamente con el toxoide de difteria. Más preferiblemente la presente invención es una composición inmunológica tetravalente que comprende polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W-135 Y de

N.meningitidis conjugado separadamente con el toxoide de difteria.

La preparación y uso de las proteínas portadoras, y una variedad de procedimientos de conjugación potencial, son bien conocidos por aquellos versados en la técnica. Los conjugados de la presente invención pueden ser preparados por aquellas personas versadas usando as enseñanzas contenidas en la presente invención lo mismo que la información ya disponible en la literatura general. La guía también puede ser obtenida a partir de todas la patentes estadounidenses siguientes, las enseñanzas de las cuales se incorporan aquí e su totalidad como referencia: U.S. 4,356,170; U.S. 4,619,828; U.S. 5,153,312; U.S. 5,422,427 y U.S. 5,445,817.

Las composiciones inmunológicas de la presente invención está hechas preparando de manera separada los conjugados de polisacárido-proteína de diferentes serogrupos meningococicos y entonces combinar los conjugados. Las composiciones inmunológicas de la presente invención pueden ser usadas como vacunas. La formulación de las vacunas de la presente invención puede

llevarse a cabo usando métodos reconocidos en la técnica. Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden también contener uno o más adyuvantes. Los adyuvantes incluyen, como vía de ejemplo pero no limitativo, adyuvantes de aluminio, adyuvante de freunds, BAY, DC-chol, pcpp, lípido a monofosforilo, CpG, QS-21, toxina de cólera y péptido de metionilo formilo. Ver, por ejemplo diseño de vacunas, la subunidad y enseñanzas adyuvantes, 1995 (M.F. Powell y M.J. Newman, eds., Plenum Press, NY). El adyuvante es preferiblemente un adyuvante de aluminio, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

Como se demuestra más abajo, las vacunas y las composiciones inmunológicas de acuerdo con la invención fomentan una respuesta inmune similar a dependiente de T en varios modelos animales, mientras que la vacuna de polisacárido fomenta una respuesta inmune similar a independiente de T. Así, las composiciones de la invención son también útiles herramientas de investigación para estudiar los caminos biológicos y los procesos involucrados en las respuestas inmunes similares a dependiente de T de los antígenos de N.meningitidis.

La cantidad de vacuna de la invención al ser administrada a un humano o animal y el régimen de administración puede determinarse de acuerdo con las técnicas estándar bien conocidas para aquellos versados en la técnica en las técnicas farmacéutica y veterinaria tomando en consideración tales factores como el antígeno particular, el adyuvante (si esta presente), la edad, sexo, peso, especie y condición del paciente o animal particular, y la vía de administración. En la presente invención, la cantidad de polisacárido-proteína portadora para suministrar una dosis eficaz para la vacunación contra la N.meningitidis puede estar entre cerca de 0,02µg a cerca de 5µg por kg del peso del cuerpo. En una composición preferida y método de la presente invención la dosificación está entre 0,1µg a 3µg por kg de peso del cuerpo. Por ejemplo, una dosificación eficaz requerirá menos anticuerpo si el tiempo de post infección que ha pasado es menos ya que existe un menor tiempo para que la bacteria prolifere. De una manera similar una dosificación eficaz dependerá de la carga bacterial en el momento de diagnóstico. Las inyecciones múltiples administradas durante un periodo de días pueden ser consideradas como una utilización terapéutica.

Los conjugados multivalentes de la presente invención pueden ser administrados como dosis única o en una serie (por ejemplo, con unos "amplificador" o "amplificadores"). Por ejemplo, un niño puede recibir una dosis única temprano en su vida, y luego administrársele una dosis de refuerzo diez años más tarde, y se recomienda usualmente para otras vacunas que impidan enfermedades en la niñez.

La dosis de refuerzo generará anticuerpos de las células B imprimadas, por ejemplo una respuesta anamnética. Esto es la vacuna conjugada multivalente fomenta una respuesta de anticuerpo funcional altamente primaria (por ejemplo luego de una administración única de la vacuna) en poblaciones jóvenes cuando se compara con la vacuna de polisacárido licenciada, y es capaz de fomentar una respuesta anamnética (por ejemplo luego de una administración de refuerzo), demostrando que la respuesta protectora inmune fomentada por la vacuna conjugada multivalente de la presente invención es duradera.

Las composiciones de la invención pueden incluir preparaciones líquidas por orificio, por ejemplo oral,

nasal, anal, vaginal, peroral, intragástrica, mucosal (por ejemplo, perlingual, alveolar, gingival, olfatoria o de la mucosa respiratoria) etc., administraciones tales como suspensiones, sueros, elixires; y, preparaciones para administración parenteral, subcutánea, intradermal, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa (por ejemplo administraciones inyectables), tales como suspensiones estériles o emulsiones. La administración intravenosa y parenteral son las referidas. Tales composiciones pueden estar en mezcla con un portador adecuado, un diluyente, o un excipiente tales como agua esterilizada, salina fisiológica, glucosa o similares. Las composiciones también pueden ser liofilizadas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes, agentes amortiguadores de pH, gelificantes o promotores de viscosidad, preservativos, agentes saborisantes, colores, y similares, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseada. Textos estándar, tales como "REMINGTON PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edición, 1985, incorporada aquí como referencia, pueden ser consultados para preparar preparaciones adecuadas, si experimentación indebida.

Las composiciones de la invención son suministradas de manera conveniente como preparaciones líquidas, por ejemplo soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones o composiciones viscosas que pueden ser amortiguadas a un pH seleccionado. Si la absorción en el tracto digestivo es la preferida, las composiciones de la invención pueden estar en la forma "sólida" de píldoras, tabletas, cápsulas, capsuletas, y similares, incluyendo preparaciones "sólidas" que son de liberación durante el tiempo o que han sido llenadas con un líquido, por ejemplo, líquido cubierto con gelatina, en donde la gelatina es disuelta en el estomago para el suministro de la gota. Si es una administración nasal o respiratoria (mucosal), las composiciones pueden estar en la forma y dispensadas por un dispensador de rociado, un dispensador de bomba o un dispensador de aerosol. Los aerosoles son usualmente bajo presión por medio de un hidrocarburo. Los dispensadores de bomba pueden dispensar de manera preferible una dosis medida o una dosis que tiene un tamaño de partícula particular.

Las preparaciones líquidas son normalmente más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosidad y las composiciones sólidas. Adicionalmente,

las composiciones líquidas son algo más convenientes para administrar, especialmente por inyección u oralmente, a animales, niños, particularmente niños pequeños, y otros que pueden tener dificultad en tragarse una píldora, tableta, cápsula o similar, o en situaciones de multidosis. Las composiciones viscosas, por otro lado, pueden ser formuladas dentro de los rangos de viscosidad apropiados para suministrar periodos de contacto más largo con la mucosa, tales como la pared del estomago o la mucosa nasal.

Obviamente, la escogencia de portadores adecuados y de otros acitivo dependerá de la ruta exacta de administración y de la naturaleza de la forma de dosificación particular, por ejemplo, dosificación líquida para con (por ejemplo, si la composición va a ser formulada en solución, una suspensión, gel u otra forma líquida), o en forma de dosificación sólida (por ejemplo, si la composición va a ser formulada como píldora, tableta, cápsula, capsuleta o forma en deliberación en el tiempo o forma rellena con líquido).

Las soluciones, suspensiones y geles, normalmente contienen una mayor cantidad de agua (preferiblemente

agua purificada) en adición al ingrediente activo. Cantidades menores de otros ingredientes tales como ajustadores del pH (por ejemplo una base tal como NaOH), emulsificadores o agentes de dispersión, agentes amortiguadores, preservativos, agentes humectantes, agentes gelificantes (por ejemplo metilcelulosa), colores y/o sabores pueden también estar presentes. Las composiciones pueden ser isotónicas, por ejemplo, estas pueden tener la misma presión osmótica de la sangre y el fluido lagrimal.

La isotonicidad deseada de las composiciones de esta invención puede llevarse a cabo usando tartrato de sodio, propilen glicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro de sodio es el preferido particularmente para amortiguadores que contienen iones de sodio.

La viscosidad de las composiciones puede mantenerse a niveles seleccionados usando agentes espesante farmacéuticamente aceptables. La metil celulosa es preferida debido a que es fácilmente y esta disponible económicamente y es fácil de trabajar. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, la goma de xantano, carboximetil celulosa, hidroxipropil celulosa,

carbonero, similares. La concentración preferida de los espesantes dependerá del agente seleccionado. El punto importante es usar una cantidad que logre la viscosidad seleccionada. Las composiciones viscosas son normalmente preparadas a partir de soluciones por la adición de tales agentes espesantes.

Un preservativo farmacéuticamente aceptable puede ser empleado para incrementar la vida en depósito de las composiciones. El benzil alcohol puede ser adecuado, aunque una variedad de preservativos que incluyen, por ejemplo, parabensos, timerosal, clorobutanol, y cloruro de benzalconio también pueden ser empleados. Una concentración adecuada del preservativo estará entre 0,02% a 2% ccn base en el peso total aunque puede haber variación apreciable dependiendo del agente seleccionado.

Aquellos versados en la técnica reconocerán que los componentes de las composiciones deben ser seleccionados como inertes químicamente con respecto a los conjugados de polisacárido-proteína portadora de la N. meningitidis.

La invención será ahora descrita adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos ilustrativos y no

limitativos establecidos en detalle de varia modalidades del concepto inventivo. Otros ejemplos de esta invención pueden ser evidentes para aquellos versados en la técnica sin salirse del espíritu de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de polvos de polisacáridos capsulares de los serogrupos A,C,W-135 y Y de la Neisseria meningitidis.

Preparación de una pasta cruda

Separadamente, cultivos de semillas congeladas en húmedo de serogrupos A,C,W135, y Y de la Neisseria meningitidis fueron deshielados y recuperados con la ayuda del medio líquido de Watson Scherp y plantados en botellas Blake que contienen el medio agar Muler Hinton. Las Blake fueron incubadas entre 35 y 37°C en una atmósfera de CO₂ durante 15 a 19 horas. Luego del periodo de incubación, el crecimiento de las botellas Blake fueron despegadas y agregadas a frascos de 4L que contienen medio de Watson Scherp. Los frascos fueron incubados entre 35 a 37°C durante 3 a 7 horas en un agitador de plataforma. Los contenidos de los frascos 4L fueron transferidos a una vasiija fermentadora que

contenía el medio de Watson Scherp. La vasija fermentadora fue incubada entre 35 a 37°C durante 7 a 12 horas controlando el contenido de oxígeno disuelto y el pH con alimentación suplementada y adiciones de antiespuma. Después del periodo de incubación, los contenidos de la vasija fermentadora fueron transferidos a un tanque de 500L, se agregó Cetavión, y el material se mezcló durante 1 hora. El crecimiento del cetavlon tratado fue centrifugado a aproximadamente 15000 a 17000 x g a una velocidad de flujo de aproximadamente 30 a 70 litros por hora. El polisacárido crudo fue precipitado del sobre nadante con una segunda precipitación cetavlon. El cetavlon fue agregado al sobre nadante y el material fue mezclado por durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. El material fue almacenado entre 1 a 5°C durante 8 a 12 horas. El polisacárido precipitado fue recolectado por centrifugación aproximadamente 45,000 a 50,000xg a una velocidad de flujo de 300 a 400 ml por minuto. La pasta recolectada fue almacenada a -60°C o más baja hasta que fue procesada adicionalmente.

Preparación en polvo del polisacárido purificado

La pasta inactivada fue deshielada y transferida a un mezclador. La pasta fue mezclada con 0,9M de cloruro de calcio para dar una suspensión homogénea. La suspensión fue centrifugada a aproximadamente 10.000g durante 15 minutos. El sobre nadante fue decantado mediante una almohadilla libre de hilachas dentro de un contenedor como un primer extracto. Un segundo volumen de 0,9M de cloruro de calcio fue agregado a la pasta, y mezclado para producir una suspensión homogénea. La suspensión fue centrifugada como se hizo anteriormente, y el sobre nadante combinado con el sobrenadante de la primera extracción. Un total de 4 extracciones fueron llevadas a cabo, y los sobrenadantes fueron reunidos. Los extractos reunidos fueron concentrados por ultrafiltración usando un espiral 10-30KDA MWCO de unidades de ultrafiltración.

Se agregó cloruro de magnesio al concentrado, y el pH se ajustó a 7, 2 a 7, 5 usando hidróxido de sodio. La DNasa y RNasa fueron agregadas al concentrado, y incubadas entre 25 a 28°C con mezclado durante 4 horas. Se agregó etanol a una concentración de 30 a 50%. El ácido nucleico y la proteína precipitados fueron removidos por centrifugación a 10.000g durante 2 horas.

El sobrenadante fue recuperado y el polisacárido precipitado por medio de agregar etanol a 80% y permitirle estarse quieto durante la noche entre 1 a 5°C. El alcohol fue retirado por sifón, y el polisacárido precipitado fue centrifugado durante 5 minutos a 10.000xg. El polisacárido precipitado fue lavado con alcohol. El polisacárido fue lavado con acetona, centrifugado entre 15 a 20 minutos a 10.000xg. El polisacárido fue sacado bajo vacío. El polvo de polisacárido inicial fue disuelto en una solución de acetato de sodio. El cloruro de magnesio fue agregado y el pH se ajustó entre 7,2 a 7,5 usando una solución de hidróxido de sodio. La DNasa y RNasa fueron agregadas a la solución e incubadas entre 25 a 28°C con mezclado durante 4 horas para remover los ácidos nucleicos residuales. Después de la incubación con estas enzimas, un volumen igual de una solución de acetato de sodio-fenol fue agregada a la mezcla polisacárido-enzima, y se colocó sobre un agitador de plataforma entre 1 a 5°C durante aproximadamente 30 minutos. La mezcla fue centrifugada a 10,000xg durante 15 a 20 minutos. La capa acuosa superior fue recuperada y guardada. Un volumen igual de una solución de acetato de sodio-fenol fue agregado a la capa acuosa, y extraído como se hizo

anteriormente. Un total de 4 extracciones fueron llevadas a cabo para remover la proteína y la endotoxina de la solución de polisacárido los extractos acuosos combinados fueron diluidos hasta 10 veces con agua para inyección, diafiltrados nuevamente 10 volúmenes de agua por inyección. Se agregó cloruro de calcio al polisacárido diafiltrado. El polisacárido fue precipitado durante la noche entre 1 a 5°C agregando etanol hasta el 80%. El sobrenadante de alcohol fue retirado, y el polisacárido recolectado por centrifugación a 10.000xg durante 15 minutos. El polisacárido purificado fue lavado 2 veces con etanol, y una vez con acetona. El polvo lavado fue secado bajo vacío en un desecador. El polvo seco fue almacenado a 30°C y menos temperatura hasta que se procese. Conjugado.

Ejemplo 2

Despolimerización del polvo de polisacárido capsular purificado de los serogrupos A,C,W135 y Y de la Neisseria meningitidis.

Los materiales usados en la preparación incluyen los polvos de polisacárido capsular purificado de los serogrupos A,C,W-135 y Y de la Neisseria meningitidis (preparados De acuerdo con el ejemplo 1), un amortiguador

de acetato de sodio estéril de 50 mM, pH 6,0, ácido clorhídrico estéril al 1N, hidróxido de sodio al 1N estéril, 30% de peróxido de hidrógeno, y salina fisiológica estéril (0,85% de cloruro de sodio).

Cada polisacárido de serogrupo fue despolimerizado en una reacción separada. Un tanque de acero inoxidable fue cargado con hasta 60g del polvo de polisacárido capsular purificado. El amortiguador de acetato de sodio de 50 mM estéril pH 6,0 fue agregado al polisacárido para proporcionar una concentración de 2,5g de polisacárido por litro. La solución de polisacárido se le permitió mezclarse entre 1 a 5°C durante 12 a 24 horas para efectuar la solución. El tanque de reacción fue conectado a una unidad intercambiadora de calor. Amortiguador de acetato de sodio al 50mM adicional, pH 6,0, fue agregado para diluir el polisacárido a una concentración de reacción de 1,25gxlitro. La solución de polisacárido fue calentada a $55^{\circ}\text{C} \pm 0,1$. Una alícuota de peróxido hidrógeno al 30% fue agregada a la mezcla de reacción para proporcionar una concentración de reacción de 1% de peróxido hidrógeno.

El curso de la reacción fue monitoreada siguiendo el cambio en el tamaño molecular del polisacárido durante el tiempo. Cada 15 a 20 minutos, se removían alícuotas de la mezcla de reacción y se inyectaban en una columna HPSEC para medir el tamaño molecular del polisacárido. Cuando el tamaño molecular del polisacárido alcanzó el tamaño molecular objetivo, la unidad de calentamiento fue apagada y la solución de polisacárido fue enfriada rápidamente a 5°C por la circulación de un baño de agua con hielo. La solución de polisacárido despolimerizada fue concentrada a 15gxlitros por medio de conectar el tanque de reacción con una unidad de ultrafiltración equipada con cartuchos de celulosa regenerada 3.000 MWCO. La solución de polisacárido despolimerizado concentrada fue diafiltrada contra 10 volúmenes de salina fisiológica estéril (0,85% de cloruro de sodio). El polisacárido despolimerizado fue almacenado entre 1 a 5°C hasta la siguiente etapa del proceso.

El tamaño molecular del polisacárido despolimerizado fue determinado pasando por una columna de cromatografía de filtración por gel vendida bajo el nombre comercial "ultrahidrogel™ 250" que fue calibrada usando estándares de tamaño molecular de dextran y por barrido con luz

láser multiangular. La cantidad de polisacárido fue determinada por el contenido fosforoso para el serogrupo A usando el método de Bartlet, G.R.J. (1959) revista de química biológica, 234, pp-466-468, y por el contenido de ácido sialico para los serogrupos C, W135 y Y usando el método de Svennerholm, L. (1955) Bioquímica Biofísica acta 24, pp604-611. El contenido de O-acetilo fue determinado por el método de Hesterin, S. (1949) revista de Química Biológica 180, p249. La actividad reductora fue determinada por el método de Park, J. T. y Jhonson, M.J. (1949) revista de Química Biológica 181, pp149-151. La integridad estructural del polisacárido despolimerizado se determinó por proteínas¹H y ¹³C NMR. La pureza del polisacárido despolimerizado fue determinada midiendo el contenido LAL (endotoxinas) y el contenido de peróxido de hidrógeno residual.

Ejemplo 3

Derivatización del polisacárido despolimerizado de los serogrupos A,C,W-135 y Y de la Neisseria Meningitidis,

Los materiales usados en esta preparación incluyen el polisacárido capsular despolimerizado peróxido de hidrógeno de los serogrupos A, C, W-135, y Y de la

Neisseria meningitidis (preparado de acuerdo con el ejemplo 2), de hidrácido de ácido adípico, carbodimida de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) (EDAC) para el serogrupo A solamente, cianborohidruro de sodio, ácido clorhídrico 1N estéril, hidróxido de sodio al 1N estéril, cloruro de sodio al 1M estéril, y salina fisiológica estéril (0,85% de cloruro de sodio).

Cada polisacárido del serogrupo fue derivatizado en una reacción separada. Un tanque de acero inoxidable fue cargado con el polisacárido despolimerizado purificado, y diluido con salina fisiológica estéril al 0,85% para lograr una concentración de reacción final de 6g de polisacárido por litro. A esta solución se agrego una alícuota concentrada de dihidrácido de ácido adípico disuelto en salina fisiológica al 0,85% estéril, para poder lograr una concentración de reacción de 1g por litro. Para el serogrupo A solamente, se agregó EDAC como una alícuota concentrada disuelta en 0,85% de salina fisiológica estéril, para lograr una concentración de reacción de 1g por litro. El pH fue ajustado a $5,0 \pm 0,1$, y este pH fue mantenido durante 2 horas usando ácido clorhídrico al 1N estéril e hidróxido de sodio al 1N estéril a temperatura ambiente (15 a 30°C). Después de 2

horas, una alícuota concentrada de cianoborohidruro de sodio, disuelto en 0,85% de salina fisiológica, fue agregada a la mezcla de reacción para lograr una concentración de reacción de 2g por litro. La reacción fue agitada a temperatura ambiente (15 a 30°C) durante 44 horas $\pm$ 4 horas mientras que se mantenía el pH en $5,5 \pm 0,5$. Luego de este periodo de reacción, el pH fue ajustado a $6,0 \pm 0,1$, y el polisacárido derivatizado fue concentrado a 12g de polisacárido por litro por medio de conectar el tanque de reacción con una unidad de ultrafiltración equipada con cartuchos de celulosa regenerada 3000 MWCO. El polisacárido derivatizado concentrado fue diafiltrado contra 30 volúmenes de cloruro de sodio al 1M, seguido por 10 volúmenes de cloruro de sodio al 0,15M. El tanque fue desconectado de la unidad de ultrafiltración y almacenado entre 1 a 5°C durante 7 días. El tanque fue reconectado a una unidad de ultrafiltración equipada con cartuchos de celulosa regenerada 3000 MWCO y diafiltrada contra 30 volúmenes de cloruro de sodio al 1M, seguido por 10 volúmenes de cloruro de sodio al 0,15M.

El tamaño molecular del polisacárido derivatizado, la cantidad de polisacárido, o el contenido de 0-acetilo

fueron medidos por los mismos métodos usados en. Polisacárido despolimerizado. El contenido de hidracida fue medido por el método del ácido 2,2,6, trinitrobenzensulfónico de Zinder, S.L. t Sobocinski, P.Z. (1975) Bioquímica Analítica 64, pp282-288. La integridad estructural del polisacárido derivatizado fue determinada por protón ^1H y ^{13}C NMR. La pureza del polisacárido derivatizado fue determinada midiendo el nivel de hidracida no ligada, el contenido de LAL (endotoxina), y el contenido residual de cianoborohidruro.

Ejemplo 4

Preparación de la proteína portadora

Preparación de la proteína de toxoide de difteria cruda

Los cultivos de semilla liofilizada fueron reconstituidos e incubados durante 16 a 18 horas. Una alícuota del cultivo fue transferida a un frasco de 0,5 litros que contenía el medio de crecimiento, y el frasco de cultivo fue incubado entre 34,5 a 36,5°C en un agitador giratorio durante 7 a 9 horas. Una alícuota del

frasco de cultivo fue transferida a un frasco de 4 litros que contenía el medio de crecimiento, y el frasco de cultivo fue incubado entre 34,5 a 36,5°C en un agitador giratorio durante 14 a 22 horas. Los cultivos del frasco de 4 litros fueron usados para inocular un fermentador que contenía el medio de crecimiento. El fermentador fue incubado entre 34,5 a 36,5°C durante 70 a 144 horas. Los contenidos del fermentador fueron filtrados a través de filtros profundos en una vasiija de recolección. Una alícuota de solución de formaldehído, 37% fue agregada a la cosecha para lograr una concentración de 0,2%. El pH fue ajustado entre 7,4 a 7,6. La cosecha fue filtrada por un cartucho de filtro de 0,2 micrones e botellas estériles de 20 litros. Las botellas fueron incubadas entre 34,5 a 36,5°C durante 7 días. Una alícuota de solución de formaldehído, 37%, fue agregada a cada botella de 20 litros para lograr una concentración de 0,4%. El pH de las mezclas fue ajustado entre 7,4 a 7,6. Las botellas fueron incubadas entre 34,5 a 36,5°C durante 7 días en un agitador. Una alícuota de solución de formaldehído, 37% fue agregada a cada botella de 20 litros para lograr una concentración de 0,5%. El pH de las mezclas fue ajustado entre 7,4 a 7,6. Las botellas fueron incubadas entre 34,5 a 36,5°C durante 8 semanas.

El toxoide crudo fue ensayado en cuanto a dextosificación. Las botellas fueron almacenada entre 1 a 5°C durante el periodo de ensayo.

Purificación de la proteína de toxoide de difteria cruda

El toxoide se le permitió calentarse temperatura ambiente, y los contenidos de las botellas de 20 litros fueron combinados en un tanque de purificación. El pH del toxoide fue ajustado entre 7,2 a 7,4 y se agregó carbón al toxoide crudo y se mezcló durante 2 minutos. La mezcla de carbón y toxoide se le permitió permanecer durante 1 hora, y luego fue filtrada a través de un cartucho de filtro profundo en un segundo tanque de purificación. Se agregó sulfato de amonio al filtrado para lograr 70% de saturación. El PH fue ajustado entre 6,8 a 7,2, y la solución se le permitió permanecer durante 16 horas. La proteína precipitada fue recolectada por filtración lavada con 70% de una solución de sulfato de amonio a saturación, pH 7,0. El precipitado fue disuelto en agua destilada estéril, y la solución de proteína fue filtrada en una vasija de recolección de acero inoxidable. El pH fue ajustado entre 6,8 a 7,2, y se agregó sulfato de amonio a 40% de saturación. El pH de la solución se

ajustó entre 7,0 a 7,2, y la solución se le permitió permanecer durante 16 horas. El precipitado fue removido por filtración y descartado. Se agregó sulfato de amonio al filtrado a 60% de saturación, y el pH se ajustó entre 7,0 a 7,2. La mezcla se le permitió permanecer durante 16 horas, y la proteína precipitada fue recolectada por filtración. El precipitado fue disuelto en agua destilada estéril, filtrado para remover la proteína no disuelta, y diafiltrado contra 0,85% DE Salina fisiológica.

Concentración y filtración estéril de la proteína de toxoide de difteria purificada

La solución de proteína fue concentrada a 15g por litro y diafiltrada contra 10 volúmenes de salina fisiológica al, 0,85% usando un cartucho de filtro de celulosa regenerado 10.000 MWCO. La solución de proteína concentrada fue esterilizada por filtración a través de una membrana de 0,2 micrones. La solución de proteína fue almacenada entre 1 a 5°C hasta que se proceso en el conjugado.

La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry, O.H.et.al. al(1951) revista de Química

28

Biológica 193,p265-275. La pureza de la proteína fue medida por esterilidad, el contenido de LAL (endotoxina), Y el contenido residual de formaldehído.

Ejemplo 5

Preparación de conjugados monovalentes de la proteína de toxoide de difteria a polisacáridos de los serogrupos A,c,w-135, y Y de la Neisseria meningitidis.

Los materiales usados en esta preparación incluyen el polisacárido derivatizado con ácido adípico de los serogrupos A,C,W-135 y Y de la Neisseria meningitidis (preparados de acuerdo con el ejemplo 3), La proteína toxoide de difteria estéril (preparada de acuerdo con el ejemplo 4), EDAC, sulfato de amonio, ácido clorhídrico al 1N estéril, hidróxido de sodio al 1N estéril, y salina fisiológica estéril (0,85%).

Cada conjugado de polisacárido de serogrupo fue preparado por una reacción separada. Todos los 4 conjugados fueron preparados por el siguiente proceso. Un tanque de acero inoxidable fue cargado con el polisacárido derivatizado con ácido adípico purificado en una concentración de reacción de 700 a 1000µmoles de

hidracida reactiva por litro y proteína de toxoide de difteria purificada en una concentración de reacción de 3,8 a 4,0 g de proteína por litro. La salina fisiológica a 0,85%, fue usada para diluir los materiales de partida de las concentraciones de reacción objetivo el pH fue ajustado a $5,0 \pm 0,1$. Una alícuota de EDAC fue agregada a la mezcla de proteína polisacárido para lograr una concentración de reacción de 2,28 a 2,4g por litro. El pH de la reacción fue mantenido en $5,0 \pm 0,1$ durante 2 horas entre 15 a 30°C. Después de 2 horas, el pH fue ajustado a $7,0 \pm 0,1$ usando hidróxido de sodio al 1N estéril, y la reacción fue almacenada entre 1 a 5°C durante 16 a 20 horas.

La mezcla de reacción se le permitió calentarse entre 15 a 30°C y la vasiija de reacción fue conectada a una unidad de ultrafiltración equipada con un cartucho de celulosa regenerada 30.000 MWCO. Se agregó sulfato de aonio sólido al 60% de saturación (para los serogrupos A,W-135 y Y) y 50% de saturación (para el serogrupo C). La mezcla de reacción conjugada fue díafiltrada contra 20 volúmenes de 60% de solución de sulfato de amonio saturada (para los serogrupos A,W-135 y Y) Y 50% de solución de sulfato de amonio saturada (para el serogrupo

C), seguido por 20 volúmenes de salina fisiológica, 0,85%. El conjugado diafiltrado fue filtrado primeramente a través de una cápsula de filtro que contenía un filtro de 1,2 y uno de 0,45 micrones, y luego a través de una segunda cápsula de filtro que contenía un filtro de 0,22 micrones.

La cantidad de polisacárido y el contenido de O-acetilo fueron medidos por los mismos métodos usados en el polisacárido despolimerizado y derivatizado. La cantidad de proteína fue determinada por el método Lowry. El tamaño molecular del conjugado fue determinado por el pasaje a través de una columna de cromatografía de filtración por gel vendida bajo el nombre comercial "TSK6000PW" que uso el DNA como un marcador de volumen vacío, el ATP como un marcador de volumen total, y la thy-roglobulina bovina como un marcador de referencia. En adición, el tamaño molecular del conjugado eluido de la columna Tks6000PW fue medido por un barrido de luz láser multiángulo. El carácter antigénico del conjugado fue medido por el ligado a los anticuerpos específicos del serogrupo del antipolisacárido usando el método de doble emparedado ELISA. La pureza de los conjugados se determinó midiendo la cantidad de polisacárido no ligado

(no conjugado) por elusión a través de una columna de cromatografía por interacción hidrofóbica, la proteína no conjugada por electroforesis capilar, esterilidad, contenido de LAL (endotoxina), contenido residual de EDAC y contenido residual del ión amonio.

Ejemplo 6

Formulación de una vacuna conjugada de toxoide de difteria y polisacárido A,C,W-135, y Y meningocócico multivalente

Los materiales usados en esta preparación incluyen, los conjugados de polisacárido de los serogrupos A,C,W-135 y Y toxoide de difteria (preparados de acuerdo con el ejemplo 5), un fosfato de sodio estéril de 100mM amortiguado con salina fisiológica (0,855 de cloruro de sodio).

Una alícuota de la salina fisiológica amortiguada con fosfato de sodio estéril de 100 a 500 mM fue agregada a salina fisiológica (0,85%) en un tanque de carga de acero inoxidable para proporcionar una concentración de vacuna final de 10mM de fosfato de sodio. Una alícuota de cada una de dos a cuatro de los conjugados estériles de

polisacárido meningocócico monovalente-toxoide de difteria fueron agregados al tanque de carga que contiene la salina fisiológica con fosfato de sodio estéril de 10mM para proporcionar una concentración final de 8µg de cada polisacárido de serogrupo por mililitro de amortiguador. El conjugado tetravalente formulado fue mezclado y filtrado a través de un filtro de 0,2µm en un segundo tanque de carga.

La cantidad de cada polisacárido de serogrupo presente en la formulación multivalente fue determinada por el análisis del componente sacárido usando una cromatografía de intercambio de anión de alto pH con detección amperométrica pulsada. La cantidad de proteína fue medida por el método de Lowry. El pH de la vacuna fue medido usando un electrodo de combinación conectada un medidor de pH. El carácter antigénico de la vacuna conjugada multivalente fue medida por medio de enlace al anticuerpo específico del serogrupo antipolisacárido usando el método de doble emparedado ELISA. La inmunogenicidad de la vacuna conjugada multivalente fue medida por la habilidad de cada conjugado presente en la vacuna para fomentar tanto una respuesta inmune antipolisacárido IgG primaria y de refuerzo en un modelo

animal. La pureza de la vacuna conjugada multivalente fue determinada por la medición de la cantidad de polisacárido no ligado (no conjugado) usando cromatografía de intercambio de anión de alto pH con detección amperométrica pulsada, esterilidad, contenido de LAL (endotoxina), contenido pirogénico, y seguridad general.

Ejemplo 7

Preparación del conjugado de polisacárido meningocócico-toxoide de difteria multivalente adyuvado con hidróxido de aluminio

La preparación del conjugado absorbido en hidróxido de aluminio. Los materiales usados en esta preparación incluyen la preparación de conjugados de polisacárido de los serogrupos A,C,W-135, y Y y toxoides de difteria descrita en el ejemplo 5, salina fisiológica estéril (0,85% de cloruro de sodio), e hidróxido de aluminio estéril en salina fisiológica (0,85% de cloruro de sodio).

Una alícuota de cada uno de los conjugados de polisacárido meningocócico monovalente estéril y toxoide

de difteria fueron agregados en el tanque de carga que contiene la salina fisiológica para proporcionar una concentración final de 8µg de cada polisacárido de serogrupo por mililitro de amortiguador. Una alícuota de hidróxido de aluminio estéril en salina fisiológica (0,85% de cloruro de sodio) fue agregada a la vacuna conjugada multivalente para lograr una concentración final de 0,44mg de ión de aluminio por mililitro de vacuna.

Ejemplo 8

Preparación del conjugado adyuvado con fosfato de aluminio

Los materiales usados en esta preparación incluyen la preparación de conjugados de polisacárido de los serogrupos A,C,W-135 y Y y el toxoide de difteria descritos en el ejemplo 5, salina fisiológica estéril (0,85% de cloruro de sodio), y fosfato de aluminio estéril en salina fisiológica (0,85% de cloruro de sodio).

Una alícuota de cada uno de los conjugados de polisacárido meningocócico monovalente-toxoide de

difteria estéril fueron agregados al tanque de carga que contenía salina fisiológica para proporcionar una concentración final de 8µg de cada polisacárido de serogrupo por mililitro de amortiguador. Una alícuota de fosfato de aluminio estéril en salina fisiológica (0,85% de cloruro de sodio) fue agregada a la vacuna conjugada multivalente para lograr una concentración final de 0,44 mg de ión de aluminio por mililitro de vacuna.

Ejemplo 9

Inmunogenicidad de la vacuna conjugada tetravalente

La vacuna conjugada tetravalente fue estudiada en cuanto a su habilidad para fomentar una respuesta inmune en animales pequeños de laboratorio antes de la evaluación en clínica. Ratones, rayas y conejos han sido usados para estudiar la inmunogenicidad de las vacunas conjugadas en relación con las vacunas de polisacárido. Estos modelos animales son útiles, por que ellos son capaces de distinguir la vacuna conjugada de los polisacáridos correspondientes por su patrón de respuesta inmune. La vacuna conjugada fomenta una respuesta inmune similar a dependiente de T en estos modelos, mientras que

la vacuna de polisacárido fomenta una respuesta inmune similar a independiente de T.

En los estudios de inmunogenicidad en ratón, el conjugado fue diluido con salina fisiológica (0,85% de cloruro de sodio) para administrar entre un cuarto a un dieciseisavo de una dosis humana. Los ratones fueron administrados con una o dos dosis de vacuna, sea conjugada o de polisacárido, y especímenes de sangre fueron tomados dos semanas después de la vacunación. Un grupo de ratones sirvió como un grupo de control no inmunizado. Los anticuerpos de cada uno de los polisacáridos de serogrupo fueron medidos por un método ELISA. Las muestras de suero fueron incubadas con exceso de cada polisacárido capsular que fue ligado al pozo de placa micro título ELISA. La albúmina de suero humano metilada fue usada para ligar cada polisacárido de serogrupo en el pozo de micro título. Luego de la incubación del pozo de micro título fue lavado con amortiguador, y un segundo conjugado de enzima-anticuerpo secundario fue agregado al complejo polisacárido-anticuerpo que liga al anticuerpo del polisacárido antimeningocócico. La placa micro título fue lavada, y un sustrato químico fue agregado al conjugado de enzima

anticuerpo secundario-anticuerpo meningococico-polisacárido. La enzima hidroliza una porción del sustrato químico que resulta en la formación de color. La cantidad de formación de color es proporcional a la cantidad de conjugado de polisacárido-anticuerpo meningococico-anticuerpo secundario-enzima que es ligado al pozo micro titulo. La potencia de la vacuna fue determinada por comparación con referencia antisuero para cada serogrupo, que es medido en la misma placa micro titulo, por un cálculo de línea paralela usando un ajuste de cuatro parámetros. El antisuero de referencia del ratón fue generado en la misma sepa de los ratones que fueron inmunizados individualmente con tres dosis de cada vacuna conjugada de serogrupo. El antisuero de referencia de ratón fue asignado a títulos con base en el inverso de la producción de dilución de una densidad óptica de 1,0.

En la tabla 1 se presenta un resumen de los títulos anti-polisacárido IgG para cada serogrupo logrado en ratones Swiss-Webster quienes fueron vacunados con dos dosis de cada una de las vacunas conjugadas tetravalentes. Ambas formulaciones líquida y de hidróxido de aluminio, o la vacuna de polisacárido tetravalente correspondiente. Los títulos IgG fueron medidos en

conjunto en un pozo de suero desde un conjunto de 10 ratones. Dos conjuntos de 10 ratones fueron usados para medir la respuesta inmune a cada formulación de vacuna. Ambos conjuntos fueron vacunados en el día 1. En el día 15 (dos semanas después de la vacunación) especímenes de sangre fueron tomados de un conjunto de 10 ratones, y el segundo conjunto de 10 ratones fue vacunado con una segunda dosis de vacuna en el día 15. Dos semanas después en el día 29, especímenes de sangre fueron tomados del segundo conjunto de 10 ratones, y del grupo de control no inmunizado. Todos los anticuerpos fueron titulados al mismo tiempo, esto es, tanto el día 15 y el día 29 los especímenes de sangre fueron ensayados al mismo tiempo junto con los controles no inmunizados y los sueros de referencia de ratón.

Tabla 1

Títulos anti-polisacárido IgG en un pozo de suero de ratones Swiss-Webster vacunados sea con el conjugado tetravalente o con el polisacárido

Grupo de vacuna	Dosis ficación µg ps	Anti-Man A		Anti Man C		Anti Man W135		Anti man Y	
		D15	D29	D15	D29	D15	D29	D15	D29
Conjugado (Sin	0.25	131	2640	250	1510	1350	6100	5660	4830

adyuvante)									
Conjugado (sin adyuvante)	0,50	171	6220	416	2050	849	26000	5980	112000
Conjugado (sin adyuvante)	1,0	249	4500	525	2740	1450	16600	11300	59100
Conjugado (hidrox. Aluminio.)	0,25	2920	4500	1010	2980	2300	33700	11600	124000
Conjugado (Hidrox. Aluminio)	0,50	5800	9550	2280	1010	4810	71900	26400	330000
Conjugado (Hidrox. Aluminio)	1,0	6210	9350	2630	12800	7870	94000	32700	302000
Polisacárido (sin adyuv.)	1,0	136	173	184	205	612	608	4470	3910
No inmunizados	n.a.	-	110	-	145	-	623	-	777

La vacuna conjugada tetravalente, tanto sin adyuvante como con adyuvante con hidróxido de aluminio, es capaz de fomentar una fuerte respuesta inmune anti-polisacárido IgG en este modelo de ratón. El adyuvante hidróxido de Aluminio sirve para mejorar tanto la respuesta primaria como de refuerzo de cada uno de los cuatro conjugados de polisacárido de serogrupo. La vacuna de polisacárido tetravalente fomenta una respuesta inmune despreciable en los serogrupos A, C y W135 en este modelo de ratón con relación al control no inmunizado, mientras que el serogrupo y si fomenta una respuesta inmune respetable,

pero no una respuesta de refuerzo. La vacuna de polisacárido tetravalente falla en fomentar una respuesta de refuerzo en todos los polisacáridos de cuatro serogrupos en este modelo. Este modelo puede ser diferenciado fácilmente entre la vacuna de polisacárido y la vacuna conjugada tanto por la magnitud de la respuesta inmune y el patrón de respuesta de refuerzo de cada una de las vacunas conjugadas de serogrupo.

La forma sin adyuvante de la vacuna conjugada tetravalente ha ido estudiada en clínica en cuanto a seguridad e inmunogenicidad en adultos saludables jóvenes y en niños saludables jóvenes. En el estudio de adultos, los sujetos fueron vacunados con una dosis única de vacuna formulada para contener 4µg de cada uno de los 4 conjugados, como polisacárido. Especímenes de sangre fueron tomados inmediatamente antes de la vacunación y 28 días después de la vacunación. Los anticuerpos de cada uno de los conjugados de serogrupo fueron medidos por una medida ELISA que cuantificó la cantidad de anti-polisacárido IgG. El método ELISA es muy similar al método usado para medir la cantidad si el anticuerpo IgG está presente e el suero de ratón.

Brevemente, las muestras de suero fueron incubadas en pozos de micro titulo ELISA que fueron recubiertos con polisacárido meningocócico en exceso que fue ligado a la placa con albúmina de suero humano metilado. La cantidad de anticuerpo ligado fue determinada por una reacción con anticuerpo monoclonal específico anti-humano IgG de ratón marcado con peroxidasa. Una reacción subsecuente usando sustratos de peroxidasa generó un producto cromogénico que fue medido expectrofotométricamente. La densidad óptica resultante del cromóforo correlaciona con la cantidad d anticuerpo IgG en el suero que es ligado al polisacárido meningocócico en la placa micro titulo. La cantidad d anticuerpo fue calculada en comparación al suero de referencia humano (CDC 1922) con un valor asignado usando el método de curva logística de 4 parámetros. En adición, los anticuerpos fueron medidos en cuanto a su habilidad para eliminar bacterias específicas del serogrupo. Las muestras de suero son completamente destruidas e inactivadas primero por calor. Las muestras de suero son diluidas por diluciones 2 veces en una placa micro titulo estéril de 96 pozos. La bacteria específica del serogrupo junto con el complemento del conejo bebe fueron agregados a las diluciones de suero y se les permitió encubarse. Después de un periodo de incubación

un medio de sobre capa de agar fue agregado a la mezcla suero/complemento/bacteria. La sobre capa de agar se le permitió endurecerse, y luego se incubó durante la noche a 37°C con 5% de dióxido de carbono. El siguiente día, las colonias bacteriales presentes en el pozo fueron contadas. El título de punto final fue determinado por la dilución de suero recíproco que proporcionó más de 50% de muerte en comparación con la media de los pozos de control de complemento.

En la tabla 2 se presenta un resumen de la media de antipolisacárido de concentraciones IGg para cada serogrupo y la media de anticuerpo bactericidal de suero (SBA) en título en suero de adulto pre y post vacunación con la vacuna conjugada tetravalente formulada en 4µg de polisacárido por dosis. La respuesta inmune a los conjugados de 4 serogrupos fueron satisfactorias, esto es comparable a la respuesta inmune lograda por la vacuna de polisacárido licenciada en términos tanto de anticuerpo IgG como de respuestas anticuerpo bactericidal funcional. La vacuna se encontró que es segura para este grupo de edades y los perfiles de seguridad se encontraron ser similares a aquella de la vacuna de polisacárido licenciada.

Tabla 2

GMC de antipolisacárido IgG (concentración media de grupo y GMT de anticuerpo bactericidal de suero (títulos promedio de grupos) para adultos saludables jóvenes vacunados con una vacuna conjugada meningocócica tetravalente formulada en 4µg por dosis por polisacárido.

Respuesta Inmune por serogrupo	N _{pre} /N _{post}	IgG GMC (µg/ml) [95% CI]		SBA GMT [95%CI]	
		Pre	Post	Pre	Post
A	28/28	3.3 [2,3-4,8]	38,4 [22,2-66.4]	487 [231-1027]	6720 4666-154281
C	28/28	0,4 [0,2-0,7]	5,5 [3,0-10,1]	16,4 [7,1-37,7]	1560 [800-4042]
W-135	28/28	0,6 [0,3-1,0]	5,8 [2,9-11,7]	10,0 [5,9-16,9]	609 [250-1481]
Y	28/28	1,3 [0,7-2,5]	6,8 [3,2-14,6]	19,0 [8,0-41,2]	390 [143-1061]

En grupos de edad más jóvenes, niños menores de 2 años de edad, la respuesta inmune a la vacuna polisacárido es débil y la inmunidad ha sido estimada que se desvanece después de un año. Los niños de 12 a 15 meses de edad se les suministraron una dosis única de vacuna conjugada tetravalente formulada en 4µg de cada polisacárido de serogrupo por dosis, y se les administró

una segunda dosis de vacuna conjugada tetravalente dos meses después de la primera dosis. Los especímenes de sangre fueron tomados antes de la primera y la segunda vacunaciones y un mes después de la segunda vacunación. La respuesta de anticuerpos de los conjugados de los cuatro serogrupos se resumen en la tabla 3. Para cada serogrupo una respuesta de refuerzo para el anticuerpo IgG y para el anticuerpo bactericidal funcional fue observada luego de la segunda dosis del conjugado tetravalente. El nivel de anticuerpo IgG fomentado por la vacuna conjugada es comparable al fomentado por el polisacárido licenciado para este grupo de edad; una respuesta después de 6 semanas de 3,64µg/ml (2,96-4,49) de respuesta de anticuerpo IgG al polisacárido del serogrupo C. Sin embargo, el nivel de anticuerpo bactericidal fomentado por la vacuna conjugada es mucho más alto que aquel que es normalmente fomentado por la vacuna de polisacárido licenciado para este grupo de edad; un título SBA post después de 6 semanas de 7,2 (5,0-10,4). La razón de este desacuerdo entre el anticuerpo IgG y el anticuerpo bactericidal en poblaciones muy jóvenes se piensa que resulta del polisacárido que fomenta una proporción alta de baja avidéz de anticuerpo en poblaciones jóvenes.

Inversamente, el conjugado parece que fomenta una proporción mucho mas alta de alta avidez de anticuerpo. La alta avidez de anticuerpo se piensa que es responsable de la actividad bactericidal.

Tabla 3

GMC de antipolisacárido IgG (concentración media de grupo) y GMT de anticuerpo bactericidal de suero (títulos promedio de grupo) para niños saludables jóvenes (1 a 2 años de edad) vacunados con dos dosis de vacuna conjugada meningococica tetravalente formulada en 4µg por dosis por polisacárido

Respuesta Inmune por serogrupo	N ₁ /N ₂ /N ₃	IgG GMC ((pg/ml) [95%CI]			SBA GMT [95%CI]		
		Pre	Pre	Post	Pre	Pre	Post
A	8/8/8/	0,2 [0,1- 0,4]	2,1 [0,9- 4,8]	4,4 [2,1- 9,11]	8,7 [1,4- 55,1]	1328 [179- 987]	3158 [1857- 5371]
C	8/8/8/	0,2 [0,0,- 0,7]	1,0 [0,3- 3,1]	1,5 [0,6- 3,6]	6,7 [2,0- 23,0]	117 [37,7- 365]	304 [128- 721]
W-135	8/8/8/	0,1 [0,1- 0,2]	0,6 [0,2- 1,9]	1,5 0,8- 3,1]	6,2 2,2- 17,2]	22,6 [2,8- 185]	430 172- 1076]
Y	8/8/8/	0,3 [0,2- 0,4]	1,2 [0,5- 2,8]	4,5 [2,7- 7,6]	5,7 [3,7- 8,8]	98,7 [20,4- 478]	304 [101- 920]

En adición a la habilidad de la vacuna conjugada tetravalente para fomentar una alta respuesta funcional de anticuerpo en poblaciones jóvenes comparada con la

vacuna de polisacárido licenciado, en la vacuna conjugada tetravalente es capaz de fomentar una respuesta anamnética, demostrando que la protección fomentada por la vacuna conjugada tetravalente de la presente invención dura largo tiempo. En el desarrollo la vacuna conjugada tetravalente, los estudios fueron conducidos primeramente sobre una formulación conjugada bivalente AC. Las vacunas ofrecen un cubrimiento más amplio que el conjugado monovalente C licenciado actual, pero no protege contra la enfermedad causada por los serogrupos w135 Y y.

Un estudio clínico fue llevado a cabo con sujetos infantes que compararon la respuesta inmune a la vacuna de polisacárido bivalente AC contra la vacuna conjugada bivalente AC. En este estudio, un tercer grupo de infantes fue involucrado para servir como grupo de control, y ellos recibieron un conjugado tipo B de *Haemophilus influenzae*. Todos los tres grupos de vacuna recibieron las mismas vacunas pediátricas. El grupo de conjugado bivalente AC recibió tres dosis de vacuna conjugada (4µg de polisacárido por dosis) a las 6, 10 y 14 semanas de edad. El grupo de polisacárido bivalente AC recibió dos dosis de una vacuna de polisacárido bivalente

AC (50µg de polisacárido por dosis) en las semanas 10 y 14 de edad. El grupo conjugado tipo b de haemophilus influenzae recibió tres dosis de vacuna conjugada en la semana 6, 10 y 14 de edad. Especímenes de sangre fueron tomados en la sexta semana, pre vacunación, y las semanas 18, 4 semanas después de vacunación. Cuando los niños tenían 11 a 12 meses de edad, especímenes de sangre fueron tomados y los niños que habían recibido sean el conjugado bivalente AC o la vacuna de polisacárido bivalente AC recibieron una dosis de refuerzo del polisacárido AC. La razón para la dosis de refuerzo del polisacárido fue evaluada en cuanto a si no los sujetos podían fomentar una respuesta aneméstica.

Los resultados de este estudio, tanto en las respuestas inmune primarias como de refuerzo del polisacárido se presenta en la tabla 4 en cuanto a la respuesta de anticuerpo IgG y la tabla 5 para la respuesta anticuerpo SBA. Las series primarias post respuesta anticuerpo IgG fueron de aproximadamente iguales tanto para las vacunas de polisacárido como la del conjugado. Sin embargo, la respuesta anticuerpo bactericidal en los sujetos vacunados con conjugada fue mucho más alta que para los sujetos vacunaos con el

polisacárido. Como se observó con sujetos de 1 año de edad, la vacunación de infantes con el polisacárido fomenta muy poco anticuerpo bactericidal funcional. El anticuerpo fomentado por los infantes con la vacuna de polisacárido es presumiblemente de baja avidez de anticuerpo, mientras, que la vacuna conjugada parece fomentar una alta avidez de anticuerpo, por lo tanto tomando en cuenta el título mucho más alto de anticuerpo bactericidal. El alto nivel de anticuerpo funcional fomentado por la dosis de refuerzo de la vacuna de polisacárido en los sujetos que habían recibido la vacuna conjugada en las series primarias de vacunación, indica que estos sujetos habían sido imprimados e cuanto a respuesta de memoria anticuerpo dependiente de células T. Los sujetos que recibieron la vacuna de polisacárido en la serie de vacunación primaria fomentaron una respuesta modesta a la dosis de refuerzo de polisacárido, lo que es indicativo de una respuesta independiente de célula T.

Tabla 4

GMC de antipolisacárido IgG (concentración media de grupo) en infantes contra los serogrupos A Y C antes y después tanto de la inmunización de series primarias (6,10 y 14 semanas de edad) y la vacunación de refuerzo

tonel polisacárido bivalente AC dada en los meses 11 y 12 de edad.

Respuesta Inmune por Grupo de vacuna	Vacunación primaria GMC [95% CI]			Vacunación de refuerzo PS GMC [95% CI]		
	N	Pre	Post	N	Pre	Post
Serogrupo A :						
Conjugado AC	34	3,4 [2,2- 5,4]	5,8 [4,3- 8,0]	31	0,2 [0,1- 0,3]	7,0 [4,0- 12,0]
Polisacárido AC	35	3,0 [1,7- 5,3]	5,5 [4,1- 7,3]	30	0,9 [0,5- 1,4]	3,1 [2,0- 4,7]
Conjugado HIB	36	3,2 [2,2- 4,5]	0,6 [0,4- 0,8]	NA	NA	NA
Serogrupo C						
Conjugado AC	31	1,6 [0,9- 2,8]	2,8 [2,0- 3,9]	31	0,1 [0,1- 0,2]	8,1 [4,5- 14,5]
Polisacárido AC	35	2,3 [1,4- 3,9]	5,3 [3,8- 7,4]	30	0,6 [0,3- 1,0]	2,8 [1,7- 4,7]
Conjugado HIB	36	2,0 [1,2- 3,5]	0,5 [0,3- 0,7]	NA	NA	NA

Tabla 5

GMT de anticuerpo SBA (título promedio de grupo) en infantes contra los serogrupos A Y C antes y después de tanto la inmunización de serie primaria (6,10 y 14 semanas de edad) como la vacunación de refuerzo con polisacárido bivalente AC dada en los meses 11 a 12 de edad.

Respuesta inmune por grupo de vacunas	Vacunación primaria GMC [95% CI]			Vacunación de refuerzo PS GMT [95% CI]		
	N	Pre	Post	N	Pre	Post



Serogrupo A :						
Conjugado AC	34	3,4 [2,2-5,4]	5,8 [4,3-8,0]	31	0,2 [0,1-0,3]	7,0 [4,0-12,0]
Polisacárido AC	35	3,0 [1,7-5,3]	5,5 [4,1-7,3]	30	0,9 [0,5-1,4]	3,1 [2,0-4,7]
Conjugado HIB	36	3,2 [2,2-4,5]	0,6 [0,4-0,8]	NA	NA	NA
Serogrupo C :						
Conjugado AC	31	1,6 [0,9-2,8]	2,8 [2,0-3,9]	31	0,1 [0,1-0,2]	8,1 [4,5-14,5]
Polisacárido AC	35	2,3 [1,4-3,9]	5,3 [3,8-7,4]	30	0,6 [0,3-1,0]	2,8 [1,7-4,7]
Conjugado HIB	36	2,0 [1,2-3,5]	0,5 [0,3-0,7]	NA	NA	NA

En adición a los beneficios que esta invención ofrece a la protección mejorada contra la enfermedad meningocócica en poblaciones jóvenes y la amplia protección contra los serogrupos A,C,W-135 y Y, el conjugado tetravalente puede suministrar protección contra otros patógenos por inducción de una respuesta de anticuerpo en la proteína portadora. Cuando la vacuna conjugada tetravalente, usando el conjugado de toxoide de difteria, fue administrada en infantes, estos sujetos también recibieron las inmunizaciones de rutina pediátrica, que incluyó el toxoide de difteria. Por lo tanto, en estos sujetos no había una mejora aparente en

la respuesta de anticuerpo el toxoide de difteria. Sin embargo, cuando el conjugado de toxoide de difteria fue administrado a los sujetos que no recibieron vacunas que contenían el toxoide de difteria con concomitantes, una respuesta de refuerzo fuerte al toxoide de difteria fue observado. Estos sujetos habían recibido 3 dosis de régimen de DPT en 2,3, y 4 meses de edad. En este estudio, los sujetos recibieron sea la dosis única de un conjugado bivalente AC o una dosis única de una vacuna de polisacárido bivalente AC entre los años 2 y 3 de edad. Especímenes de sangre fueron tomados en. Tiempo de la vacunación y 30 días después de vacunación. El conjugado bivalente AC que usó toxoide de difteria como la proteína portadora.

La respuesta inmune del toxoide de difteria en los dos grupos vacunados se presenta en la tabla 6. El polisacárido no sirvió para estimular una respuesta inmune antidifteria en estos sujetos como se esperaba sin embargo una fuerte respuesta inmune antidifteria fue observada en los sujetos que recibieron el conjugado AC. Por lo tanto, la vacuna de conjugado meningocócico puede suministrar un beneficio adicional de estimular una respuesta inmune a la proteína portadora así

suministrando protección contra enfermedades causadas por la corynebacteria diphtheriae cuando el toxoide de difteria es usado como proteína portadora.

Tabla 6

Anticuerpo antidifteria por ELISA GMT (título promedio de grupo) en IU/ml en niños saludables jóvenes vacunados sea con la vacuna de conjugado toxoide de difteria bivalente AC formulada en 4µg como polisacárido por dosis o una vacuna bivalente de polisacárido AC formulada en 50µg como polisacárido por dosis.

Respuesta inmune por grupo de vacuna	N _{pre} /N _{post}	Anticuerpo antidifteria (ELISA-IU/ml) [95% CI]	
		Pre	Post
Conjugado AC	104/103	0,047 [0,036-0,060]	21,2 [11,6-38,6]
Polisacárido AC	103/102	0,059 [0,045-0,076]	0,059 [0,045-0,077]

Referencias:

Frasch, C. E., Zollenger, W. D. and Poolman, J. T.
(1985) Review of Infectious Diseases 7, pp. 504-510.

Reido, F. X., Plikaytis, B. D. and Broome, C. V. (1995)
Pediatric Infectious Disease Journal 14, pp. 643-657.

Artenstein, M. S., Gold, R., Zimmerly, J. G., Wyle, F.
A., Schneider, H. and Harkins, C. (1970) The New England
Journal of Medicine 282, pp. 417-420.

Peltola, H., Mäkelä, H., Käyhty, H., Jousimies, H.,
Herva, E., Hällström, K., Sivonen, A., Renkonen, O. V.,
Pettay, O. Karanko, V., Ahvonen, P., and Sarna, S. (1997)
The New England Journal of Medicine 297, pp. 686-691.

Reingold, A. L., Broome, C. V., Hightower, A. W., Ajello,
G. W., Bolan, G. A., Adamsbaum, C., Jones, E. E.,
Philips, C., Tiendrebeogo, H., and Yada, A. (1985) The
Lancet 2, pp. 114-118.

Goldschneider, I., Lepow, M. L., Gotschlich, E. C., Mauck, F. T., Bachl, F., and Randolph, M. (1973) The Journal of Infectious Diseases 128, pp. 769-776.

Gold, R., Lepow, M. L., Goldschneider, I., and Gotschlich, E. C. (1977) The Journal of Infectious Diseases 136, S31-S35.

Brandt, B. L. and Artenstein, M. S. (1975) The Journal of Infectious Diseases 131, pp. S69-S72.

Käyhty, H., Karanko, V., Peltola, H., Sarna, S., and Mäkelä, H. (1980) The Journal of Infectious Diseases 142, pp. 861-868.

Cessey, S. J., Allen, S. J., Menon, A., Todd, J. E., Cham, K., Carlone, G. M., Turner, S. H., Gheesling, L. L., DeWitt, W., Plikaytis, B. D., and Greenwood, B. (1993) The Journal of Infectious Diseases 167, pp 1212-1216.

Wyle, F. A., Artenstein, M. S., Brandt, G. L., Tramont, E. C., Kasper, D. L., Altier, P. L., Berman, S. L., and Lowenthal, J. P. (1972) The Journal of Infectious Diseases, 126, pp. 514-522.

Jennings, H. J. and Lugowski, C. (1981) The Journal of Immunology 127, pp. 1011- 1018.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunológica que comprende 2,3 o 4 conjugados de polisacárido-proteína distintos, e donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de 2 o más serogrupos de *N. meningitidis* conjugado con una o más proteínas portadoras.
2. La composición inmunológica de la reivindicación 1 en donde los polisacáridos capsulares son seleccionados del grupo que consiste de polisacáridos capsulares de los serogrupos A,C,W-135 y Y de la *N.meningitidis*.
3. La composición inmunológica de la reivindicación 1, en donde los polisacáridos capsulares son de los serogrupos A y C de la *N.meningitidis*.
4. La composición inmunológica de la reivindicación 1, en donde los polisacáridos capsulares son de los serogrupos A,C,W-135 y Y de la *N. meningitidis*.
5. La composición inmunológica de la reivindicación 1, en donde la proteína portadora es toxoide de difteria.

6. La composición inmunológica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un adyuvante.

7. La composición inmunológica de la reivindicación 5, en donde el adyuvante es hidróxido de aluminio-

8. La composición inmunológica de la reivindicación 5 en donde el adyuvante es fosfato de aluminio.

9. Un método para inducir una respuesta inmunológica en un polisacárido capsular de *N. meningitidis* que comprende administrar una cantidad inmunológicamente efectiva de la composición inmunológica de la reivindicación 1 a un humano o animal.

10. Una vacuna meningocócica multivalente que comprende cantidades inmunológicamente efectivas de 2 a 4 conjugados de polisacárido-proteína distintos, en donde cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado con una proteína portadora, y en donde cada polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste de polisacárido capsular de los serogrupos A, C, W-135 y Y.

11. La vacuna meningococica multivalente de la reivindicación 9, en donde los polisacáridos capsulares son preparados de los serogrupos A y C de la N. meningitidis.

12. La vacuna meningococica multivalente de la reivindicación 9, en donde los polisacáridos capsulares son preparados de los serogrupos A,C,W-135 y Y de la N. meningitidis.

13. La vacuna meningococica multivalente de la reivindicación 9, en donde la proteína portadora es toxoide de difteria.

14. La vacuna meningococica multivalente de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente un adyuvante.

15. La vacuna meningococica multivalente de la reivindicación 13, en donde el adyuvante es hidróxido de aluminio.

16. La vacuna meningococica multivalente de la reivindicación 13, en donde el adyuvante es fosfato de aluminio.

17. Un método para proteger un humano o animal susceptible a la infección de la N. meningitidis que comprende administrar a lo humano o animal una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna de la reivindicación 9.

110

RESUMEN

La presente invención describe una vacuna combinada que ofrece una amplia protección contra la enfermedad meningocócica causada por la bacteria patogénica *Neisseria meningitidis*. La vacuna esta compuesta de cuatro conjugados de polisacárido-proteína distintos que son formulados como una dosis única de vacuna. Los polisacáridos capsulares purificados de la *Neisseria meningitidis* serogrupos A,C,W-135 y Y son activados químicamente y ligados selectivamente a una proteína portadora por medio de un enlace químico covalente, formando conjugados de polisacáridos-proteína capaces de fomentar una inmunidad de largo tiempo una variedad de cepas de *N.meningitidis* en niños lo mismo que en adultos.

111

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 03065841 00000000 Folios: 111
Fecha (MM): 2003-08-01 16:48:09
Tramite : 011 PCI-PATENT 379 FASE NUCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2820 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NOTA: 33070707-2

ESTADO ACTUAL DE LOS DATOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

FORMA DE PRESENTACION DE LA SOLICITUD

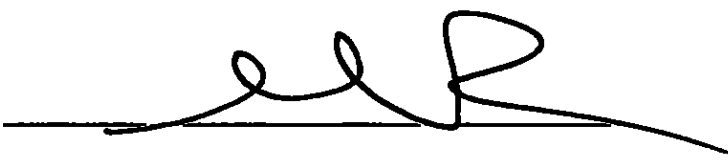
INDICADOR	TIPO	FECHA	CONCEPTO	NO. REG.	FECHA REG.	VALOR
DE FASE PRESENTACION	DE PRESENTACION	FORMA POPULAR	350-1110-2	350000	01/07/2003	33,000,000.00

FORMA DE PRESENTACION DE LA SOLICITUD

INDICADOR	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
DE FASE PRESENTACION	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INV.	33,000,000.00
	TOTAL :	\$ 33,000,000.00

DE PRESENTACION DE LA SOLICITUD

FECHA REG.



FECHA DE LA SOLICITUD AL PRESENTE DIA

660 13082-041-001-7

112

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y APLICACION DEL
TRAMITE

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

COMPLETA () INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

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

COMPLETA () INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

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

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma Responsable:

Educa Navarro
01-08-2003

Fecha:



2020
Bogotá, D.C.,

113

08431

Doctor:
Emilio Ferrero
Apoderado
Aventis Pasteur, INC.

ASUNTO:	Radicación N°	03-065841
	Solicitud Internacional	PCT/US2002/01963
	Fecha Inicio fase nacional	23/08/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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

☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486).

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

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


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

1.0 OCT. 2003:

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