



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

03-99742

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO

CONJUGADOS INMUNOGENICOS DE ACIDO HIALURONICO DE BAJO

PESO MOLECULAR CON TOXINAS POLIPEPTIDAS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 47/48

71. SOLICITANTEs

BAXTER INTERNATIONAL INC. y BAXTER HEALTHCARE S.A.

DOMICILIOs

Deerfield, Illinois, Estados Unidos de América y
Kanton, Zurich, Suiza, respectivamente.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

Código No. 1092

22. BOGOTÁ, D. C.

SS
01



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



03 099742 00

PÉTIMORIO

SECCIÓN REGISTRO Y MARCA
Indicaciones : 0399742 0000000 Folio 157
Fecha (HMS): 2002-11-11 17:44:19
Trámite : 411 PCT-PATENTE 179 FINE INEI 411 PRESENTE
Impulsación por 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)

Nombres: BAXTER INTERNATIONAL INC.
y BAXTER HEALTHCARE S.A.
sociedades constituidas y existentes bajo
las leyes del Estado de Delaware,
Estados Unidos de América y Suiza,
respectivamente.

Direcciones: One Baxter Parkway
Deerfield, Illinois 60015,
Estados Unidos de América
y Heristrasse 2, Wallisellen,
Kanton, CH-8308 Zurich,
Suiza, respectivamente.

Domicilios: Deerfield, Illinois,
Estados Unidos de América,
y Kanton, Zurich,
Suiza, respectivamente.

IDENTIFICACION

C.G. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____

Número: _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 38 11

Fax: 217 92 11

E-mail: clientes@camvp.com.

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACION

C.G. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____Número: 438.019 T.P. 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1- Francis MICHON
4401 Rosedale Avenue,
Bethesda, Maryland 20814,
Estados Unidos de América.

3 Maryline LAUDE-SHARP
16721 Gooseback Terrace,
Olney, Maryland 20832,
Estados Unidos de América.

2- Samuel MOORE
7425 Brandenburg Circle,
Sykesville, Maryland 21784,
Estados Unidos de América.

4- Milan BLAKE
8521 Beauford, Avenue,
Fulton, Maryland 20769,
Estados Unidos de América.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP02/05310Publicación Internacional No. WO 02/092131 A3Fecha: 10 de mayo de 2002Fecha: 21 de noviembre de 2002

6

Título (84)

**CONJUGADOS INMUNOGÉNICOS DE ÁCIDO HIALURÓNICO DE BAJO
PESO MOLECULAR CON TOXINAS POLIPÉPTIDAS**

7

Clasificación Internacional (81) A61K 47/48

8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
		US	11 de mayo de 2001	08/853.367

9 Comprobante de pago No.: 03 - 78.176 Fecha: 27 de octubre de 2003

Anexos:

- 10
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 400.000
 - ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
 - ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
 - ☒ Poderes, si fuere el caso. De BAXTER INTERNATIONAL; INC.
 - ☐ 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.
 - ☒ Acta 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:

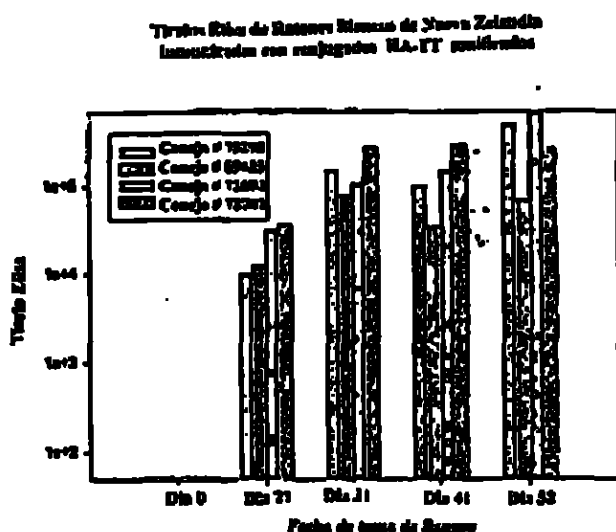


Figura 4

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA: 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

 MRM/mrm-ld-4

03273
02613

PODER

Yo (nosotros), abajo firmado(s)
BAXTER INTERNATIONAL INC.
domiciliado(s) en
Deerfield, Illinois, E.E.U.U.
por el presente conferimos poder a
GERMAN CAVELIER tpa. 832 ✓
GONZALO PERDOMO tpa. 831 ✓
EMILIO FERRERO tpa. 31929 ✓
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ tpa. 23555 ✓
Domiciliados en la Carrera 4a. No. 72-35,
Bogotá, Colombia

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial, a cuyo efecto autorizamos a los dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas y de servicio; el depósito de nombres comerciales y enseñas; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria, y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) las acciones de oposición, cancelación, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y juicios que promovamos o se nos promuevan; y c) para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandado, transigir, desistirse, cancelar, recibir, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado hoy junio 16 de 1993
en Deerfield, Illinois 60015 E.E.U.U.,...

BAXTER INTERNATIONAL INC.

A. GERARD SIECK, ASSISTANT SECRETARY

Ramón R. de Muro
Traductor e Interpreté Oficial
Traducción en Bogotá, 1993

POWER OF ATTORNEY

18/00/11/10 No. 13 G-328 05/1/93
Inscribed - 11/1/93
y

I (we), the undersigned BAXTER INTERNATIONAL INC.

of Deerfield, United States of America, ...

hereby grant to Messrs. Cavalier,

GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO,
EMILIO FERRERO, LUZ CLEMENCIA DE
PAEZ.

Professional Cards Numbers: 832, 831, 31929,
and 23555 respectively. Domiciled at
Carrera 4a. No. 72-35, Bogotá, Colombia

and to obtain the protection of my (our) industrial property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of trademarks, collective and service marks; the deposit of commercial names and ensigns; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us); and that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys-in-fact in or out of Court.

Given and signed this JUNE 16, 1993
in DEERFIELD, ILLINOIS 60015, USA

07 NOV 2003



Consulado General de Colombia

122 SOUTH MICHIGAN AVENUE, SUITE 1441
CHICAGO, ILLINOIS 60603

TEL (312) 341-0658 FAX (312) 341-1980

No. 1610, 93

Chicago, JUN 23 1993

El suscrito Cónsul General de Colombia, CERTIFICA que el señor Linda Ianuzzi Hess quien autoriza el presente documento, ejerce legalmente, en la fecha allí expresada, las funciones de Secretaria del Condado y que la firma y sello que en el documento aparezcan como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales, de acuerdo con el registro que se lleva en este consulado.

El Cónsul no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE
US\$ 6.00 (Seis dólares)
PAGADO DERECHOS CONSULARES
FONDO ROTATORIO

Maria Teresa Gonzalez
Encargada de Funciones Consulares
Consulado General de Colombia



LINDA IANUZI HESS
LAKE COUNTY CLERK
18 NORTH COUNTY STREET
WAUKEGAN, ILLINOIS 60085

Bernarda R. de Martinez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 653 Minjuntales 1991

General Services 708/360-3610 • Elections 708/360-6628 • Tax Extension & Redemption 708/360-6657

STATE OF ILLINOIS)
COUNTY OF LAKE) SS

CERTIFICATE OF AUTHORITY

I, Linda Ianuzzi Hess, County Clerk of Lake County in the State of Illinois, which office is an office of record having a seal, certify that Mary H. Cross by whom the foregoing or annexed document was notarized, was, on the 26 day of June, 1990, appointed a Notary Public in and for the County of Lake, State of Illinois and that as such, full faith and credit is and ought to be given to this Notary's official attestations. In testimony whereof I have affixed my signature and the seal of this office this 17 day of June, 1993.

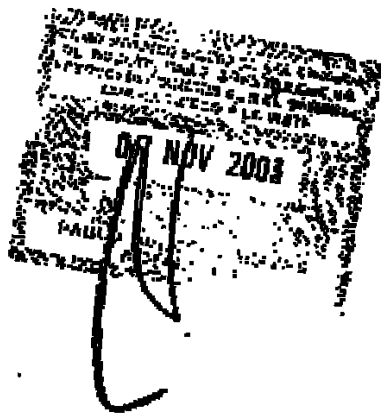
Certification not valid unless the seal of Lake County, Illinois is affixed.

Linda Ianuzzi Hess
LINDA IANUZI HESS
LAKE COUNTY CLERK

113-208 12/88

Bernardo E. de Maribus
Oradorado e Interprete Oficial
Resolución 473 del Ministerio 1984

No. 481652
MONTAÑA GONZALEZ
35 APR 1983
J. M. GONZALEZ
J. M. GONZALEZ



6

TRADUCCION OFICIAL No. 8.90.93 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor al mismo tiempo que la presente. Esta traducción ha sido preparada por Bernarda R. de Martínez, Traductora Oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia mediante Resolución No. 683 de 1991.

(Se traducen sellos y legalizaciones que aparecen a continuación de un Poder escrito en inglés y español otorgado por la sociedad BAXTER INTERNATIONAL INC., a favor de los Doctores GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO Y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ).

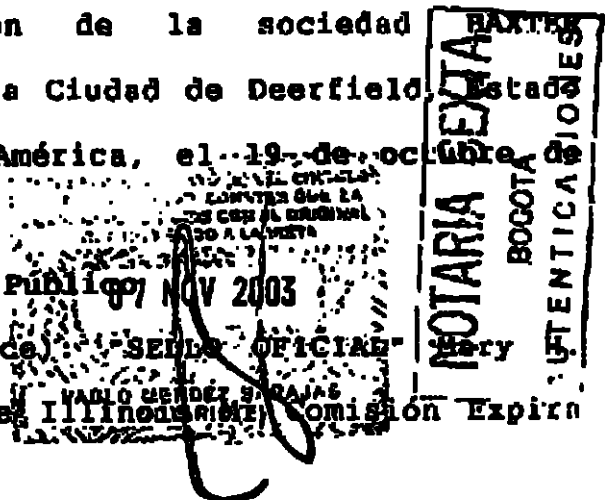
Dado y firmado hoy 16 de junio de 1993, en Deerfield, Illinois, Estados Unidos de América, por el señor A. GERARD SIECK, ASSISTANT SECRETARY

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia y representación de la sociedad BAXTER INTERNATIONAL INC., expedido en la Ciudad de Deerfield, Estado de Illinois, Estados Unidos de América, el 19 de octubre de 1993.

(Firmado), Mary H. Cross, Notario Público

(Sello Notarial en tinta que dice):

Cross, Notario Público, Estado de Illinois
6/26/94



CERTIFICACION

LINDA LANUXI HESS

ESCRIBANO DEL CONDADO LAKE

18 NORTH COUNTY STREET

WAUKEGAN, ILLINOIS 60085

Servicios Generales 708/360-3610 * Elecciones 708/360-6628 *

Prórrogas y Redenciones de Impuestos 708/360-6657

ESTADO DE ILLINOIS)

) SS

CONDADO DE LAKE)

CERIFICADO DE AUTORIDAD

Yo, Linda Ianuzzi Hess, Escribano de Condado del condado de Lake en el Estado de Illinois, cuya oficina es una oficina de registro que tiene un sello, certifico que Mary H. Cross quien ha notarizado el documento anterior o adjunto, era el 26 de junio de 1990, Notario Público nombrado en y para el Condado de Lake, Estado de Illinois y como tal, todas sus certificaciones deben ser reconocidas. En testimonio de lo cual he firmado y estampado el sello de esta oficina hoy junio 17 de 1993.

(Firmado): LINDA IANUZI HESS

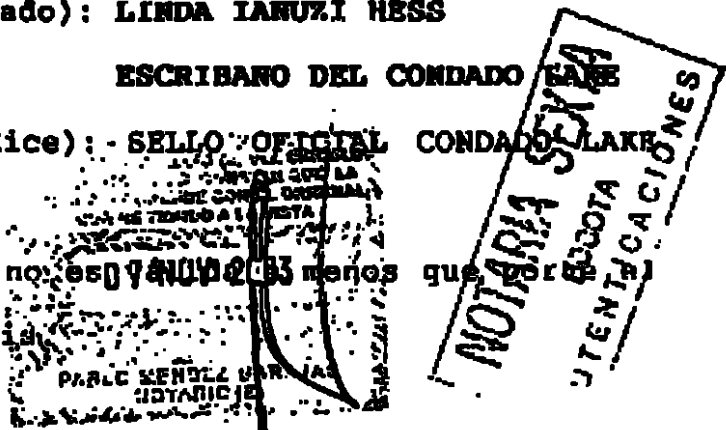
ESCRIBANO DEL CONDADO LAKE

(Sello seco en relieve que dice): SELLO OFICIAL CONDADO LAKE ILLINOIS

(Impreso): Esta certificacion no es valida sin el sello del Condado Lake, Illinois

(Impreso): 113-208 12/89

(En español): Legalización de la firma que antecede hecha por el CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN CHICAGO, ILLINOIS, bajo el No. 1610/93, de fecha junio 29 de 1993, firmada por la señora María Teresa González, Encargada de Funciones Consulares.



Pagados Impuesto de Timbre y Derechos Consulares por valor de veintiun dólares.

(Sello Consular en tinta que dice): CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA * CHICAGO *

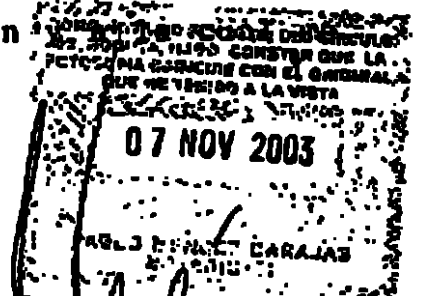
Legalización de la firma que antecede hecha por el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA bajo el No. 481652 de fecha 5 de agosto de 1993, firmada por el señor Nelson Sánchez Torres, Jefe Legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación remito.

Bogotá, agosto 9 de 1993

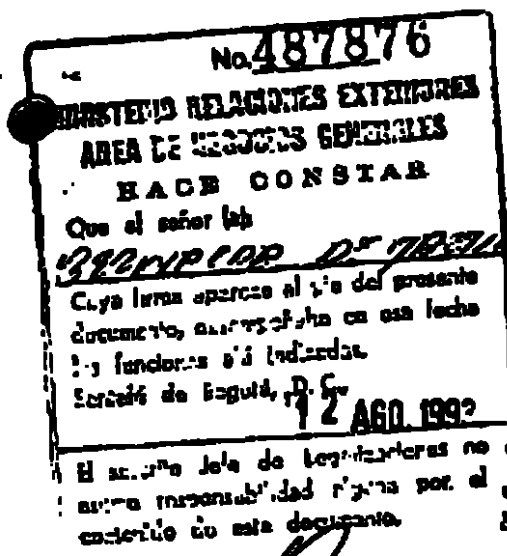
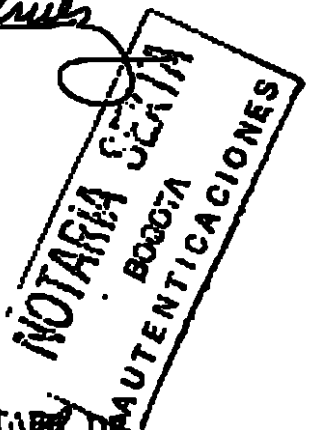
COLO 5873-702-001-4

BRM-27



Bernardo R. de Martínez

Bernardo R. de Martínez
Traductor e Interpreté Oficial
Resolución 603 Ministerio 1991



COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DE SANTAFE DE BOGOTA DECLARAR QUE LA FIRMA PUESTA EN ESTE DOCUMENTO...

C. C. No. _____
con registrada en esta Notaría
SANTAFE DE BOGOTA D. C.

CHIZ TORRES
LEGALIZACIONES



10 AGO. 1993

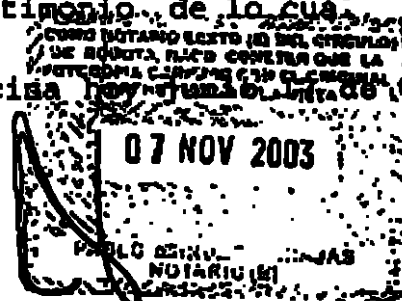
TRADUCCIÓN OFICIAL No. 08.03/00 preparada por María Elvira Martelo, Traductora Oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

MODIFICACIÓN A LA TRADUCCIÓN OFICIAL No. 8.90.93. REALIZADA POR BERNARDA R. DE MARTÍNEZ CON FECHA 9 DE AGOSTO DE 1993.

Se modifica específicamente lo que se subraya en la siguiente transcripción de la parte de la traducción que corresponde al CERTIFICADO DE AUTORIDAD otorgado por el Escribano del Condado de Lake, la cual dice así: "Yo, Linda Ianuzi Hess, Escribano de Condado del Condado de Lake en el Estado de Illinois, cuya oficina es una oficina de registro que tiene un sello, certifico que Mary H. Cross quien ha notarizado el documento anterior o adjunto, era el 26 de junio de 1990. Notario Público nombrado en y para todo el Condado de Lake, Estado de Illinois y como tal, todas sus certificaciones deben ser reconocidas. En testimonio de lo cual, he firmado y estampado el sello de esta oficina por el mes de junio de 1993".

PARA QUE AHORA SE LEA ASÍ:

Y , Linda Ianuzi Hess, Escribano de Condado del Condado de Lake en el Estado de Illinois, cuya oficina es una oficina de registro que tiene un sello, certifico que Mary H. Cross, quien ha notarizado el documento anterior o adjunto, fue nombrada el 26 de junio de 1990 un Notario Público en y para todo el Condado de Lake, Estado de Illinois y como tal, a todas sus certificaciones deben ser reconocidas. En testimonio de lo cual, he firmado y estampado el sello de esta oficina h y junio 17 de 1993.



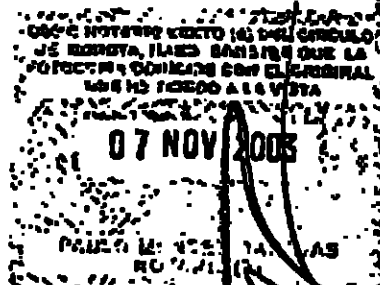
(Al dorso) Legalización de la firma que antecede expedida por el
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES bajo el No. 481652 del 5 de
agosto de 1993, firmada por el Jefe de Legalizaciones.

Es traducción fiel de la cual se deja copia en esta oficina para
su confrontación.

COLO WPCL 5873-702-001-4

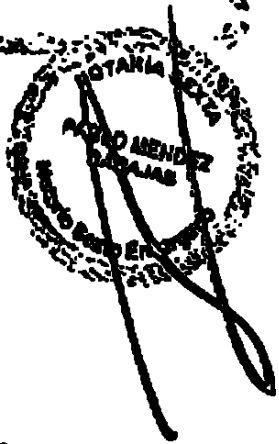
MAR.13/00

Maria E. Martelo
TRADUCCION No. 08.03/00
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
733930
ELVIRA MARTELO
OFICINA DE LEGALIZACIONES
MAR 14 2000
OFICINA DE LEGALIZACIONES
SECRETARIA GENERAL

COMPROBANTE DEL CANCELAMIENTO
DEBIDO A LA FALTA DE CANCELACION DE
[Handwritten signature]
CONCIERNE CON LA FIRMA REGISTRADA P.
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA 14 MAR 2003



COMPROBANTE DEL CANCELAMIENTO
DEBIDO A LA FALTA DE CANCELACION DE
FOTOCOPIA CONCIERNE CON EL ORIGINAL
CUMPLE CON LA LEY
07 MAR 2003

TELÉFONO 1571 (11) 2121133
FAX 15479 CAVE CO
1231740 2121133 CAVE UC

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 40, No. 72-35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL CAVE
TELEFONO (57) (1) 2120138
CARLOS CAVELEYES

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

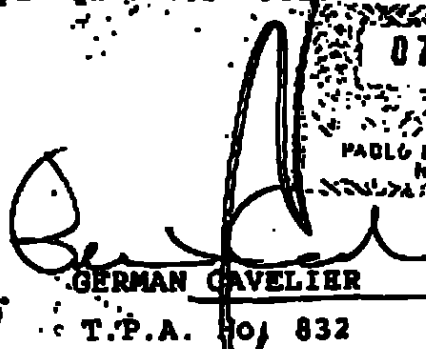
Poderdante: BAXTER INTERNATIONAL INC.

Poder conferido el: 16-06-93

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder conferido en el doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 56 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros ~~documentos~~ faltan en este momento.

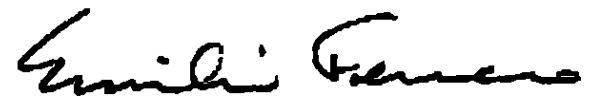
Señor Jefe,


GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

Acepto:


EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén

2e-780-2

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

DECLARACIONES Y PRESENTACION PERSONAL

ABR 1997

Yo, Emilia Fierro
de BOGOTA
del CIRO GARCIA DE BOGOTA
de BOGOTA

que Emilia Fierro
de BOGOTA C.C. 458019

y (o) 2872924

donde (llego) en BOGOTA a las 10:00 horas que me
presento en el poder BOGOTA a las 10:00 horas y que
mantengo los mismos datos
en adelante se firma esta declaracion

7 NOV 2003

NOTARIA SEXTA
BOGOTA
AUTENTICACIONES

Emilia Fierro



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(43) International Publication Date
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/092131 A2

(51) International Patent Classification: A61K 47/48

(21) International Application Number: PCT/EP02/05310

(22) International Filing Date: 10 May 2002 (10.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/853,367 11 May 2001 (11.05.2001) US

(71) Applicants: BAXTER INTERNATIONAL INC.
(US/US): One Baxter Parkway, Deerfield, IL 60015 (US).
BAXTER HEALTHCARE S.A. [CH/CH]: Hardstrasse
2, Wallisellen, Kanton, CH-8306 Zurich (CH).

(72) Inventors: MICHON, Francis; 4401 Rosedale Av-
enue, Bethesda, MD 20814 (US). MOORE, Samuel;
7425 Hensdenburg Circle, Sykesville, MD 21784 (US).
LAUDF-SHARP, Marylou; 18721 Gorsebrook Turnpike,
Olney, MD 20832 (US). BLAKE, Milan; 8521 Beamford
Avenue, Pahn, MD 20759 (US).

(74) Agent: BASSETT, Richard, S.; Eric Porter Clarkson,
Park View House, 58 The Ropewalk, Nottingham NG1
5DD (GB).

(81) Designated States (national): AE, AQ, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GD, GR, GU,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RI, RU, SD, SI, SG, SL,
SK, SM, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

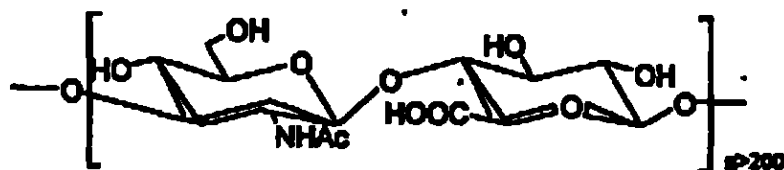
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (CH, GM,
KR, LU, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CI, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: IMMUNOGENIC COMPOSITIONS OF LOW MOLECULAR WEIGHT HYALURONIC ACID AND METHODS TO
PREVENT, TREAT AND DIAGNOSE INFECTIONS AND DISEASES CAUSED BY GROUP A AND GROUP C STREPTO-
COCCI



(57) Abstract: The present invention
provides antigenic compositions and
methods for treatment and prevention
of infection and disease caused by
group A and group C streptococci.
In particular, the invention provides
low molecular weight hyaluronic acid,
low molecular weight hyaluronic acid
linked to a carrier and compositions

comprising them. The compositions elicit antibodies to low molecular weight hyaluronic acid which are cross-reactive with group
A and C streptococci and which are minimally cross-reactive with native hyaluronic acid. The invention is particularly useful for
providing both active and passive immunogenic protection for those infected with or at risk infection with group A and group C
streptococci. Additionally, the present invention provides methods and compositions useful for diagnosing infections and diseases
caused by group A and group C streptococci.

WO 02/092131 A2

13

**Immunogenic Compositions of Low Molecular Weight Hyaluronic Acid
and Methods To Prevent, Treat and Diagnose Infections and Diseases
Caused by Group A and Group C Streptococci**

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to hyaluronic acid/polypeptide conjugate molecules, and pharmaceutical compositions comprising them. In particular the present invention relates to hyaluronic acid, and more preferably, low molecular weight hyaluronic acid (LMW-HA), and LMW-HA/polypeptide conjugate molecules that elicit antibodies to hyaluronic acid which are cross-reactive with both group A and group C streptococci. The molecules of the invention and pharmaceutical compositions comprising them are useful for the treatment and prevention of infection and for the diagnoses of disease caused by group A and group C streptococci.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Hyaluronic acid (HA) is a naturally occurring glycosaminoglycan. It is made up of repeating units of *N*-acetylglucosamine and glucuronic acid. See Figure 1. HA occurs in animal tissue, e.g. spinal fluid, ocular fluid, synovial fluid, skin, and also in some streptococci, such as in the capsules of group A and group C streptococci. Such mucoid or highly encapsulated strains of group A streptococci have been associated both with unusually severe infections, and with acute rheumatic fever (Johnson et al, 1992, *J. Infect. Dis.* 166:374-382). Human invasive soft-tissue infections caused by group A and group C streptococci are associated with significant morbidity and mortality. Group C streptococci are also associated with pharyngitis and reactive arthritis. Further, group C streptococcal infections are prevalent in horses.

The mucoid colony morphology of group A and group C streptococci is a result of

abundant production of capsular polysaccharide composed of hyaluronic acid. The hyaluronic acid capsule of group A streptococci has recently been shown to exhibit a number of important roles in the pathogenicity of these organisms. Among other things, the HA capsule protects mucoid group A streptococci from phagocytosis and has an important role in virulence (Wessels et al. 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8317-21; Dale et al. 1996, *Infect. Immunol.* 64:1495-501; and Moses et al. 1997 *Infect. Immunol.* 65:64-71). In addition, the HA capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for the attachment of group A streptococcus to CD44 on human keratinocytes. The group A streptococcal HA capsule is both highly conserved and surface-exposed which indicates that HA may serve as a universal adhesion site for the attachment of other strains of bacteria to the pharyngeal mucosa and to the skin (Schrager et al 1998, *J. Clin. Invest.* 101:1708-16).

Preventing and treating infections of gram-positive pathogens such as streptococci are particularly important because of the development of resistant strains which are both difficult to treat and difficult to eradicate once established. Although conjugation of polysaccharide antigens, or of immunologically inert carbohydrate haptens, to thymus dependent (TD) antigens such as proteins enhances their immunogenicity, it was not evident whether such an immunogenic response, if elicited against HA, would provide protection against HA containing bacteria, such as group A or group C streptococci. Further, the presence of HA both in mammalian tissue and on streptococci complicates the development of HA as a carbohydrate antigen to treat or prevent streptococcal infection because of a potential to elicit an autoimmune response directed at the host tissue.

Until recently, HA has been thought to be a nonimmunogenic molecule (Meyer, 1936, *J. Biol Chem.* 114:689 and Humphreys, 1943, *Biochem J.* 37:460). However, more recent

studies indicate that naturally occurring antibodies to HA are present in several species (Underhill, 1982, *Biophys. Res. Commun.* 108:1488). Fillit et al. induced antibodies to HA in mice with HA bound to liposomes. They report that HA is immunogenic and identified two antigenic determinants on the molecule. Fillit et al. also noted that the mode of presentation of HA on the liposome is important to its immunogenicity. Finally, Fillit et al. reported that an HA antibody was cross-reactive with heparan sulfate and that such cross-reactions could be involved in the pathogenesis of autoimmune vascular disease (Fillit et al., 1988, *J. Exp. Med.* 168:971-982). Based on the reports summarized above, it remains unpredictable whether HA or HA conjugates would elicit an immune response useful for inhibiting or treating infection from HA containing bacteria such as group A or group C streptococci.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides for an immunogenic composition comprising HA and LMW-HA conjugated to a polypeptide or protein carrier. The conjugate molecules of the present invention are useful for eliciting antibodies that are cross-reactive to bacteria containing HA, such as both group A and group C streptococci. The conjugate molecules of the present invention and pharmaceutical compositions comprising them are useful in a method for the treatment and diagnoses of infection and disease caused by such bacteria, including group A and group C streptococci.

Applicants have surprisingly discovered that the LMW-HA conjugates are immunogenic in mammals. Even more surprisingly, applicants discovered that antibodies elicited by the conjugates of the invention are cross-reactive with groups A and C streptococci but are only minimally cross-reactive with native IIA associated with mammalian tissue.

16

Methods for conjugating LMW-HA to polypeptides include reductive amination, treatment with cyanogen bromide, amide bond formation between a free amino group on the carrier and a carboxylate moiety on the LMW-HA, or by use of a linker molecule. The invention provides pharmaceutical compositions comprising conjugate molecules of LMW-HA and the use of these compositions to elicit antibodies for the treatment of infection by HA containing bacteria such as groups A and C streptococci, as vaccines, and for diagnostics. Any polypeptide that converts a carbohydrate T cell independent response to a T cell dependent response is suitable for use as a carrier. Examples are toxins or toxoids such as tetanus toxoid, diphtheria toxoid, and pertussis toxins or toxoids, neisserial porins, e.g., PorA of gonococci, and PorB of meningococci.

The present invention also provides pharmaceutical compositions, vaccines and other immunological reagents derived from the immunogenic LMW-HA-polypeptide conjugates.

The invention is further directed to a method of immunizing a mammal against bacterial infections. The method comprises administering an effective amount of the pharmaceutical composition of the invention to a mammal for deterring infection from a disease causing organism. The methods are useful for preventing or treating infection by bacteria containing HA, such as group A and group C streptococci.

The invention also provides a method of eliciting antibodies in mammals, preferably humans, with the inventive LMW-HA-polypeptide conjugates. The invention also provides for an immunoglobulin composition and isolated antibody that are elicited in response to immunizing a mammal using the polysaccharide-polypeptide conjugates of the invention. Such immunoglobulin and isolated antibody are useful as therapeutic agents and as diagnostic reagents.

The immunoglobulins and antibodies produced are specific for LMW-HA. The

conjugate molecules of the invention are also useful for raising monoclonal and anti-idiotypic antibodies according to well known methods.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG 1: Structure of hyaluronic acid (HA).

FIG 2: Generation of antigenic low molecular weight LMW-HA by sonication and/or acid treatment.

FIG 3: Structure of the streptococcal HA protective epitope; a) tetrasaccharide from sonicated HA; b) tetrasaccharide generated after the action of hyaluronidase.

FIG 4: ELISA titers of rabbit antisera to sonicated HA-TT conjugates.

FIG 5: ELISA titers of rabbit antisera to acid hydrolyzed LMW-HA/TT conjugates.

FIG 6: Titration of rabbit antisera to sonicated LMW-HA/TT conjugates.

FIG 7: Titration of rabbit antisera to acid hydrolyzed LMW-HA/TT conjugates.

FIG 8: Inhibition of rabbit antiserum # 75295 with acid hydrolyzed HA, sonicated HA, and sonicated HA conjugate on LMW-HA/HSA coated plates.

FIG 9: Inhibition of rabbit antiserum # 75295 with sonicated HA, native HA, D-glucuronic acid, HA disaccharide, and HA tetrasaccharide on LMW-HA/HSA coated plates.

FIG 10: Inhibition of rabbit antiserum # 72700 with sonicated HA, native HA, D-glucuronic acid, HA disaccharide, and HA tetrasaccharide on LMW-HA/HSA coated plates.

FIG 11: Inhibition of rabbit antiserum # 72700 with sonicated HA, native HA, HA disaccharide, HA tetrasaccharide, and HA hexa/octasaccharide on LMW-HA/HSA coated plates.

18

FIG 12: ELISA titers of BALB/c mouse antisera to LMW-HA/rPorB conjugate.

FIG 13: ELISA titers of CDI mouse antisera to LMW-HA/rPorB conjugate.

FIG 14: Passive immunization of Balb/c mice with rabbit antisera; challenge with GAS type 6 (4,400 cfu/mL). Respectively, ▽ rabbit antisera against PBS/CFA; ○ rabbit antisera against sonicated LMW-HA/TT; ○ rabbit antisera against sonicated LMW-HA/TT; ▽ rabbit antisera against sonicated LMW-HA/TT.

FIG 15: Passive immunization of Balb/c mice with rabbit antisera; challenge with GAS type 3 (2.5×10^5 cfu/mL). Respectively, ▽ rabbit antisera against PBS/CFA; ○ rabbit antisera against sonicated LMW-HA/TT; ○ rabbit antisera against acid hydrolyzed LMW-HA/TT; ▽ rabbit antisera against sonicated LMW-HA/TT.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Hyaluronic acid is used as an immunogen to raise a protective and/or therapeutic response. In particular, HA is useful for raising an immune response that is cross-reactive with bacteria, such as group A and group C streptococci, that have HA on their surface. Without being bound by theory, it is believed that the epitope cross-reactive with group A and group C streptococci is about 3 or 4 residues in length and is located at the nonreducing terminal. There does not appear to be a significant difference whether the non-reducing terminal glucuronic acid residue is saturated or unsaturated as both epitopes are protective. In addition, it appears that the terminal glucuronic acid is converted to unsaturated glucuronic acid in blood and other body fluids. HA can terminate in either a glucosaminyl or glucuronyl residue, the immune response is enhanced when the percentage of glucuronic acid or unsaturated glucuronic acid at the nonreducing terminal of HA is increased over the percentage of *N*-acetylglucosamine.

Although native HA may be used for preparing conjugates according to this invention, preferably LMW-HA that is from about 3 or 4 saccharides to about 2000 saccharides or from about 600 daltons to about 400 Kd in size is used to prepare conjugates. More preferably, the LMW-HA is about 4 saccharides or 2 repeat units to about 100 repeat units or about 800 daltons to about 40 Kd in size. A most preferred size for the LMW-HA is about 4 repeat units to about 10 or about 20 repeat units or about 800 daltons to about 4 or 8 Kd. The LMW-HA can be obtained from native HA, which typically has a molecular weight of 400 Kd to several million daltons (available from Sigma or by purification according to U. S Patent No. 4,141,973), by various methods including sonication (Kubo K; et al. *Glycoconj J.*, 1993,10(6):435) or by chemical (Blatter G, *Carbohydr. Res.* 1996, 288:109-125 and Halikes K. M. *Carbohydr. Res.* 1998, 309: 161-164) and/or enzymatic (De Luca et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1995 117:5869-5870) methods.

The invention also provides for LMW-HA molecules containing glucuronic acid residues at the nonreducing terminal. One method for obtaining glucuronic acid terminal HA fragments is by sonication of native HA according to the method of Kubo K; et al. *Glycoconj J.*, 1993,10(6):435. The percentage of molecules with a glucuronic acid terminal can be increased by treatment of the sonication product with an α -N-acetyl glucosaminidase to remove any non-reducing terminal N-acetyl glucosaminyl residues and provide LMW-HA with a higher percentage of glucuronyl residues at the nonreducing terminal of the molecules. An alternative method for obtaining LMW-HA includes treating native HA under mildly acidic conditions to generate molecules containing a mixture of N-acetyl glucosaminyl and glucuronyl residues at their nonreducing ends. The terminal nonreducing glucosaminyl groups on the acid depolymerized LMW-HA can be removed with an α -N-acetyl glucosaminidase to provide

LMW-HA with glucuronyl residues at the nonreducing terminal of the molecules. See Figure 2. The invention also provides LMW-HA molecules containing 4,5-unsaturated glucuronyl residues at the nonreducing terminal. See Figure 3. One method for obtaining 4,5-unsaturated glucuronyl terminated HA fragments is by treatment of native HA with hyaluronidase.

The LMW-HA for use with the present invention consists of fragments wherein at least about 90% of the LMW-HA fragments have glucuronic acid or unsaturated glucuronic acid at their nonreducing terminal. Preferably, at least about 95% of the LMW-HA fragments for use with the invention have a glucuronic acid or an unsaturated glucuronic acid at their nonreducing terminal.

When using sonication, native HA can be dissolved in a suitable solvent, such as phosphate buffered saline, and the solution sonicated until the desired amount of depolymerization is obtained. See, for example, Kubo et al. *Glycoconj. J.*, 1993, 10:435. The LMW-HA obtained by such treatment preferably has a molecular weight of about 10-20 Kd and contains mainly glucuronic residues at their nonreducing terminal end, i.e. greater than 95%.

In addition, LMW-HA fragments containing a mixture of *N*-acetylglucosaminy and glucuronyl residues at their nonreducing ends can be obtained by treatment of HA under mildly acidic conditions. About 50% of the LMW-HA fragments obtained by this method have glucuronic acid at their nonreducing terminal. Subsequent to the acid treatment, the terminal nonreducing glucosaminy groups can be selectively removed from the fragments with an α -*N*-acetyl glucosaminidase (available from Sigma) to expose glucuronyl residues at the terminal end of the molecules. By varying the reaction conditions, the percentage of fragments with terminal nonreducing glucosaminy groups can be controlled. For example, the reaction can be stopped by disrupting the enzyme with heat or pH at various points of completion to obtain the

desired percentage of fragments with glucuronic acid at their nonreducing terminal.

In addition, LMW-HA with either *N*-acetyl- β -D-glucosamine or β -D-glucuronic acid at the reducing end can be chemically synthesized by methods known in the art. See Blatter G, *Carbohydr. Res.* 1996, 288:109-125 and Halkes K. M. *Carbohydr. Res.* 1998, 309: 161-164. For example, a suitably protected glucosamine-glucuronic acid disaccharide can first be prepared from the corresponding monosaccharides. The monosaccharides can be coupled by methods known in the art, such as by the use of an α -trichloroacetamidoglucopyranose as the glycosyl donor. The resulting disaccharide can then be repeatedly coupled with itself to form LMW-HA of varying size. For example, the anomeric protecting group on the glucuronic acid portion of the disaccharide can be selectively removed. A preferred protecting group for this position is the 4-methoxyphenyl group. For the reducing-end disaccharide, i.e. the first glycosyl acceptor, the anomeric position can be converted to a methoxy moiety, for example, by first converting the 4-methoxyphenyl group to anomeric hydroxyl by treatment with ceric ammonium nitrate. The resulting anomeric hydroxyl group can be converted to an α -trichloroacetimidate moiety by treatment with trichloroacetonitrile and DBU. The α -trichloroacetimidate moiety can be converted to the methoxy moiety by treatment with anhydrous methanol followed by treatment with trimethylsilyl triflate and triethylamine. For disaccharides to be used as glycosyl donors, the anomeric position can be converted to the α -trichloroacetimidate moiety as described above. The methoxy-protected disaccharide described above can be used as a glycosyl acceptor after selectively removing the protecting group at the 3 position of the glucosamine residue. A preferred protecting group for this position is the chloroacetyl group which can be removed by treatment with thiourea and pyridine in ethanol. The disaccharide donor can be coupled to the acceptor in an iterative manner to produce LMW-HA, i.e., each successive coupling produces

LMW-HA with an additional repeat unit. Additional preferred protecting groups for the glucosamine residue are a 4,6-*O*-benzylidene group and a 2-*N*-trichloroacetamido group. Additional preferred protecting groups for the glucuronic acid residue are 6- and 4-*O*-benzoyl groups and a C6 methyl ester. The use of these and alternative protecting groups is described in "Protective Groups In Organic Synthesis," 2nd Ed., by T.W. Greene and P.G.M. Wuts, 1991, John Wiley & Sons, Inc., which is incorporated herein by reference.

HA fragments can also be synthesized enzymatically using uridine diphosphate-sugars and HA synthetase. See, for example, De Luca et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1995 117:5869-5870. These last two methods allow for the synthesis of LMW-HA having any percentage of glucuronic acid at its terminal. Thus, the formation of LMW-HA by enzymatic degradation, enzymatic synthesis or by chemical synthesis allows for the production of greater than about 98%, or greater than about 99% of the LMW-HA fragments having a glucuronic acid or an unsaturated glucuronic acid at their nonreducing terminal.

The LMW-HA may be coupled to a carrier by methods known in the art. See, for example, Dick and Beurret in *Conjugate Vaccines*, Cruse et al. eds., *Contrib. Microbiol. Immunol.*, Basel, Karger, 1989, vol. 10, pp 48-114 and Jennings and Sood in *Neoglycoconjugates: Preparation and Applications*, Lee et al. eds., Chapter 10, pp 325-371, 1994, Academic Press, San Diego. The methods include reductive amination, coupling through the carboxylate moiety, the use of linkers, and the use of cyanogen bromide or its derivatives. When conjugating LMW-HA to a carrier, it is preferable to avoid alteration of the epitope at the nonreducing end of the polysaccharide. A preferred method of conjugating LMW-HA to carrier is by direct conjugation such as by reductive amination at the reducing terminal saccharide. For example, a reducing terminal end group may be selectively introduced into LMW-HA by

reduction of the reducing terminal residue with, for example a borohydride, followed by periodate oxidation and reductive amination. See, for example, Jennings U.S. Patent No. 4,356,170.

Methods which conjugate LMW-HA to a carrier at various locations along the back-bone of the LMW-HA can also be used. For example, LMW-HA can be activated by the use of periodate to generate aldehyde groups in the backbone residues of the polysaccharide and the activated LMW-HA is then treated with a carrier containing a free amino group in the presence of a reducing agent such as a borohydride. These methods also permit conjugation of more than one carrier molecule to a single LMW-HA which permits cross linking.

The polypeptide component of the conjugate molecules of the invention may be any physiologically tolerated protein or polypeptide which evokes a T cell dependent response when coupled to LMW-HA. The term polypeptide is intended to be a generic term that includes peptides, polypeptides and proteins including native, modified, or recombinant proteins. Examples of polypeptides useful as carriers include, but are not limited to, bacterial toxins, toxoids, porins, outer membrane proteins, and cross-reactive protein materials. Such polypeptides include, but are not limited to, tetanus toxoid, diphtheria toxoid, pertussis toxoid, an immunogenic polypeptide derived from streptococci, an immunogenic polypeptide derived from influenza, an immunogenic polypeptide derived from meningococci, an immunogenic polypeptide derived from pneumococci, and an immunogenic polypeptide derived from *E. coli*. In particular, tetanus toxoid, diphtheria toxoid, CRM₁₉₇, and porin polypeptides from, hemophilus, *E. coli* and neisseria, such as rPorB, are preferred. See for example U.S. Patent No. 5,439,808.

The conjugate molecules prepared according to the present invention typically

24

comprise a carrier polypeptide or protein to which is bound at least one low molecular weight hyaluronic acid fragment through a single binding site at the terminal end of the backbone of the polysaccharide fragment. Thus, the present invention provides the ability, if desired, to produce low molecular weight hyaluronic conjugate molecules wherein the polysaccharide component, except for one end, is unobscured by the carrier. These types of conjugates may be referred to as neoglycoproteins. See, for example, Dick and Beurret, *supra*. Alternatively, cross-linked conjugates may be formed according to the present invention. These types of conjugates may be referred to as lattice conjugates. See, for example, Dick and Beurret, *supra*.

The molecular ratio of LMW-HA to polypeptide or protein in the conjugate molecules of the invention is preferably between about 1 to about 100 molecules LMW-HA per molecule polypeptide or protein. More preferably the ratio is between about 10 and about 20 molecules LMW-HA or epitopes per molecule of polypeptide or protein. Alternatively, the ratio of LMW-HA to polypeptide or protein can be determined by weight. For example, the conjugate molecules of the invention are between about 10% and about 500% weight LMW-HA to weight polypeptide or protein. Preferably, the conjugates of the present invention are about 30% to about 100% weight LMW-HA to weight polypeptide or protein. In one embodiment, very low molecular weight hyaluronic acid, i.e., less than about 20 repeat units, is used to form conjugates which increases the density of the epitope. Variations in LMW-HA/polypeptide or protein ratio may be achieved by adjusting the conjugation conditions, especially the ratio of the starting components in the conjugation reaction.

In addition to providing conjugate molecules comprising low molecular weight hyaluronic acid conjugated to polypeptide or protein, the present invention also encompasses multivalent conjugates and pharmaceutical compositions and vaccines comprising the

multivalent conjugates wherein different polysaccharides are conjugated to a single polypeptide. For example, low molecular weight hyaluronic acid may be bound to polypeptide or protein in various combinations with other polysaccharides. Examples of such polysaccharides are the capsular polysaccharides from *Haemophilus influenzae* type b; group B streptococcus type Ia, and Ib, II, III, IV, V, VI, and VIII; meningococcal groups A, B and C; and group A streptococcus polysaccharide.

The immunogenic conjugates according to the present invention provide useful pharmaceutical compositions, such as vaccines, which are important for providing protection against infection by HA containing bacteria, such as group A and group C streptococci, in mammals, particularly humans and horses. Further, these vaccines are useful for administration to pregnant females as a means of providing protective antibodies to a neonate prior to birth.

The immunogenic compositions of the invention may be used as a means for raising monoclonal, polyclonal, or anti-idiotypic antibodies useful for prophylactic, therapeutic and diagnostic purposes. Diagnostics are particularly useful in monitoring and detecting various infections and diseases caused by HA containing bacteria such as group A or group C streptococci. The immunogenic compositions of the present invention may be used as an immunogen for use in both active and passive immunogenic protection in those individuals infected or at risk of infection especially by group A or group C streptococci. The bactericidal antibodies used for passive protection are produced by immunizing a mammal with any of the immunogenic compositions of the invention and then recovering bactericidal antibodies. The bactericidal antibodies for use with the present invention may be present in serum, a partially purified fraction such as a gamma globulin fraction, or purified antibodies. For example, IgG can be purified from crude protein mixtures, such as serum or ascitic fluid, by using protein A-

or protein G-agarose. Protein A binds to the Fc portion of IgG. Protein G also binds to the Fc region, but can also bind to the Fab region, making it useful for purification of F(ab)₂ fragments of IgGs. Crude samples of IgGs can be purified using a protein A- or protein G-agarose columns. Serum samples, ascitic fluid or tissue culture supernatant should be diluted at least 1:1 with buffer before applying to a column. After applying the sample, the column is washed with a wash buffer, e.g. 20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4, until most of the impurities are removed. The IgG is then eluted with elution buffer, e.g. 100 mM glycine, pH 3.0. The IgG can then be concentrated by diafiltration or further purified by ionic exchange or size exclusion chromatography.

"Humanized" antibodies (including chimeric and CDR-grafted antibodies), antibody fragments, and especially bi-specific antibodies based on the claimed monoclonal antibodies are within the contemplation of the present invention, as are recombinant antibody-related products produced in procaryotic or eucaryotic cells. For example, antibody fragments, such as Fab and F(ab)₂ fragments, can be produced in culture by host cells such as *E. coli*, yeast, insect and mammalian cells upon determination of structural (sequence) information for the variable regions of the antibodies of the invention. See, for example, U. S. Patent No. 6,180,377. Sequence information for the variable regions also enables preparation of CDR-grafted antibodies. Moreover, chimeric antibodies (e.g., mouse/human antibodies) may be prepared using transformed mouse myeloma cells or hybridoma cells and bi-specific antibodies may be produced by hybrid hybridoma cells.

The pharmaceutical compositions and vaccines of the invention are typically formed by dispersing the low molecular weight hyaluronic acid and/or conjugate in a suitable pharmaceutically acceptable carrier, such as physiological saline, phosphate buffered saline or

other injectable liquids. The pharmaceutical composition or vaccine may be administered parenterally, for example subcutaneously, intraperitoneally, or intramuscularly. Additives customary in pharmaceutical compositions such as vaccines may also be added; for example, stabilizers, such as lactose or sorbitol, and adjuvants such as aluminum phosphate, aluminum hydroxide, aluminum sulphate, monophosphoryl lipid A, QS21, or stearyl tyrosine. Such pharmaceutical compositions may comprise the low molecular weight hyaluronic acid, its conjugate, or antibodies to low molecular weight hyaluronic acid and/or to its conjugate. The compositions may be administered alone or in combination with at least one other agent, such as an adjuvant or a stabilizing compound, which may be administered in any sterile, biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited to saline, buffered saline, dextrose, and water. The compositions may be administered alone to a patient, or in combination with other agents, drugs, hormones, or biological response modifiers.

The pharmaceutical compositions and vaccines are administered in amounts sufficient to provoke an immunogenic response. Dosages will normally be within the range of about 0.1 to 50 μ g of conjugate molecule per kilogram of body weight. Dosages may be adjusted based on the size, weight, or age of the individual and is well within the level of skill in the art. A series of doses may be given for optimum immunity. The antibody response in an individual can be monitored by determining antibody titer or bactericidal activity and the individual may be boosted, if necessary, to enhance the response.

The present invention provides compositions comprising antibodies, such as purified antibodies, gamma globulin fractions and serum useful for providing passive immunity to mammals infected or in danger of being exposed to HA containing bacteria, especially group A or group C streptococci. Among the many pathologies caused by streptococci is the invasive

soft tissue infection which is associated with significant morbidity and mortality. See, for example, Ashbaugh et al. *J. Clin. Invest.*, 1998, 102:550. The IgGs, antibody fragments, antibodies, gamma globulin fractions, and serum provided by the present invention are useful for inhibiting or preventing infection from HA containing bacteria, such as group A and group C streptococci and the resulting tissue necrosis and other pathologies resulting from such infection. Pharmaceutical compositions comprising antibodies, such as purified antibodies, gamma globulin fractions and serum are typically formed by dispersing the antibodies in a suitable pharmaceutically acceptable carrier, such as physiological saline, phosphate buffered saline or other injectable liquids. The pharmaceutical compositions may be administered parenterally, for example subcutaneously, intraperitoneally, or intramuscularly. Additives customary in pharmaceutical compositions may also be added. The compositions may be administered alone or in combination with at least one other agent, such as a stabilizing compound, which may be administered in any sterile, biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited to saline, buffered saline, dextrose, and water. The compositions may be administered alone to a patient, or in combination with other agents, drugs, hormones, or biological response modifiers.

The pharmaceutical compositions comprising antibodies are administered in amounts sufficient to inhibit bacterial infection. Dosages may be adjusted based on the size, weight, or age of the individual and is well within the level of skill in the art. A series of doses may be given for optimum immunity. The dose response in an individual can be monitored by determining antibody titer or bactericidal activity and the individual may be given additional doses, if necessary, to enhance the response.

Antibodies prepared according to the present invention are also useful for preparing various immunoreagents and for use in immunoassays. For example, for

Immunoassays the low molecular weight hyaluronic acid fragments or their conjugates may be immobilized either directly or through a linker, such as a polypeptide linker, to a solid support. Methods similar to those used to make conjugates can be used for immobilization. The antibodies can then be used in various immunoassay systems known to those in the art including, radioimmuno assays and ELISA for detecting the presence of HA containing bacteria, such as group A or group C streptococci. Such assays may be used for diagnosing the presence of infection in individuals by assaying for the presence of group A or group C streptococcal antibodies in serum or other body fluids.

The examples presented herein are meant to exemplify the various aspects of carrying out the invention and are not intended to limit the scope of the invention in any way. All publications, patents and articles referred to within this specification are hereby incorporated in their entirety into this specification.

EXAMPLE 1

Preparation of LMW-HA

Depolymerization of Hyaluronic Acid by Acid Hydrolysis

Hyaluronic acid (100 mg, Lifecore lot 1-9062-5) was added to a 10 ml solution of 0.05 N HCl. The mixture was heated at 80 °C for 2 hours, and stirred in order to dissolve the entire solid. The sample was then heated for another 1.5 hours at 100 °C. The depolymerization was monitored by removal of aliquots from the reaction mixture at various times and analysed on a Bio-Rad system (Biologic) equipped with a Supcrlose® 12 HR 10/30 column (Pharmacia). The solution was neutralized with 0.5 N NaOH, then dialysed with a Diaflo® membrane of molecular weight cut-off (MWCO) 3,500 and lyophilized. The product was molecular size fractionated through a Superdex® 200 PG (Pharmacia) column to yield 65 mg of solid product. ¹H-NMR analysis of the samples at 500 MHz confirmed the structure of the disaccharide-repeating unit of

hyaluronic acid (HA). The average molecular weight of the generated fragment was estimated by size-exclusion chromatography coupled with multiangle laser light scattering photometry (SEC MALLS) to be about 12,000 daltons.

Preparation of HA Oligosaccharides Containing D-Glucuronic Acid at their Nonreducing Ends

Hyaluronic acid (100 mg, Lifecore lot 1-9062-5) is treated with 0.1 N HCl at 60 °C for 10 hours. The solution is neutralized with 0.5 N NaOH and desalted through a Sephadex® G-20 (Pharmacia) column eluted with water. The desalted product is freeze dried and treated with β -N-acetyl glucosaminidase (EC 3.2.1.30; Calbiochem) to generate LMW-HA fragments with about 4 to about 20 repeat units and containing D-glucuronic acid at their nonreducing ends. The structure of the oligosaccharides is confirmed by NMR spectroscopy and methylation analysis.

Depolymerization of Hyaluronic Acid by Sonication

Hyaluronic acid (100 mg, Lifecore lot 1-9062-5) was dissolved in 20 ml of 10 mM PBS buffer, and the suspension stirred until dissolved. The sample was sonicated with a Branson sonicator model 450, (sonication settings: Output control: 3; Duty cycle: 50%; temperature: 2 °C) for 18 hours. After dialysis and lyophilization, 57 mg of solid product was recovered. The average molecular weight of the resulting sonicated hyaluronic acid was determined to be 18,000 daltons by SEC-MALLS using a MiniDawn instrument (Wyatt technology, Santa Barbara, CA) and a Superose® 12 HR 10/30 column (Pharmacia). ¹H-NMR analysis of the samples at 500 MHz confirmed the structure of the disaccharide-repeating unit of hyaluronic acid.

31

EXAMPLE 2
Preparation of LMW-HA Conjugates

Reduction of acid-treated Hyaluronic Acid with NaBH₄

Hyaluronic acid, depolymerized with hydrochloric acid (65 mg), was dissolved in 6.5 ml of deionized water. The pH was adjusted to 10 with 0.5 N NaOH and 64.5 mg of NaBH₄ added to the solution. The reaction mixture was held at room temperature for 2 hours. The excess NaBH₄ was destroyed with 1 M acetic acid. Dialysis against deionized water with a Diaflo® membrane of MWCO 3,500 followed by lyophilization yielded 35 mg of solid product.

Periodate oxidation of reduced acid-treated Hyaluronic Acid

Two 18 mg samples of the reduced and sized polysaccharides were dissolved in 1.3 ml and 0.87 ml of a 10 mM aqueous solution of NaIO₄ to achieve a degree of oxidation (d.o.) of 10 and 20 percent respectively. The reactions were stirred in the dark for 2 hours at room temperature, and each was quenched with 20 µl of ethylene glycol. The reaction mixtures were then dialyzed and lyophilized to provide 17 mg of solid product.

Preparation of acid-treated Hyaluronic Acid-Tetanus Toxoid Conjugate (LMW-HA/TT)

Periodate-oxidized (d.o. 10% and 20%) acid-treated hyaluronic acid (10 mg of each respectively) and purified tetanus toxoid monomer (5 mg for each sample, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) were dissolved in 0.5 mL of 0.2 M sodium phosphate, pH 7.4. Recrystallized sodium cyanoborohydride (10 mg for each sample) was added and the mixture held at room temperature overnight. The progress of the reaction was monitored at various times using a Bio-Rad (Biologic) system equipped with a Superose® 12 HR 10/30 column (Pharmacia). Conjugation of polysaccharide to protein was indicated by a progressive increase of a UV (280 nm) peak eluting in the void volume of the column. After conjugation was completed, 10 mg of NaBH₄ in 1 ml of 0.1 N NaOH was added to each sample in order to

WO 02/097131

PCT/EP02/05310

reduce any remaining unconjugated aldehyde. The conjugate was purified by passage over a column (1.6 x 60 cm) of Superdex® 200 PG (Pharmacia) eluting with 10 mM PBS containing 0.01 percent thimerosal. Fractions corresponding to the void-volume peak were pooled and stored at 4 °C. They were designated conjugates 1 and 2 for 10 and 20 percent oxidation in their polysaccharides, respectively.

Periodate oxidation of Sonicated Hyaluronic Acid

Two samples of 26 mg and 30 mg of the sonicated polysaccharides were each dissolved in 2 and 1.5 ml of deionized water, respectively and treated with 0.65 ml and 1.5 ml of 10 mM aqueous NaIO₄ to reach degrees of oxidation (d.o.) of 10 and 20 percent, respectively. The reactions were stirred in the dark for 2 hours at room temperature, and each reaction was quenched with 20 µl of ethylene glycol. The solutions were then dialyzed and lyophilized to provide 24 and 25 mg of product, respectively.

Preparation of Sonicated Hyaluronic Acid-Tetanus Toxoid Conjugate (LMW-HA/TT)

Sonicated and periodate-oxidized HA (7 mg of each sample, d.o. 10% and 20%) and purified tetanus toxoid monomer (3.5 mg for each sample) were dissolved in 350 µl of 0.2 M sodium phosphate at pH 7.4. Sodium cyanoborohydride (7 mg for each sample) was added, and the mixtures held at room temperature overnight. The progress of each conjugation reaction was monitored by removal of aliquots from the reaction mixture at various times and subsequent analysis on a Bio-Rad (Biologic) system equipped with a Superose® 12 HR 10/30 column (Pharmacia). Conjugation of polysaccharide to polypeptide was indicated by the progressive increase of a UV absorbing peak (280nm) eluting in the void volume of the column. After conjugation was completed, NaBH₄ (10 mg in 1 ml of 0.1 N NaOH for each sample) was added to the reaction mixtures to reduce any remaining unconjugated aldehyde. The conjugates were

purified by passage over a Superdex® 200 PG (Pharmacia) column, eluted with 10 mM PBS containing 0.01 percent thimerosal. Fractions corresponding to the void-volume peak were pooled and stored at 4 °C and were designated conjugates 3 and 4 for 10 and 20 percent oxidation in their polysaccharides, respectively.

Coupling of Sonicated Hyaluronic Acid to Recombinant Class 3 Neisserial Porin (LMW-HA/rPorB)

Sonicated and periodate-oxidized hyaluronic acid (20 mg, 20% d.o.) and rPorB (10 mg) were dissolved in 717 µl of 0.25 M HEPES buffer, pH 8.5, containing 0.25 M NaCl and 0.05 percent Zwittergent Z 3,14 (Calbiochem, San Diego, CA). Sodium cyanoborohydride (20 mg) was added, and the mixture incubated at 37 °C for 1 day. After the conjugation was completed, 10 mg of sodium borohydride in 1 ml of 0.1 N NaOH was added to the reaction mixture to remove any remaining aldehyde. The conjugate was purified by passage over a column of Superdex® 200 PG (Pharmacia), eluted with 10 mM PBS containing 0.01 percent thimerosal. Fractions corresponding to the void-volume peak, as monitored by UV absorbance at 280 nm, were pooled and stored at 4 °C and labeled as conjugate 5.

Preparation of Hyaluronic Acid-Human Serum Albumin Conjugates (LMW-HA/HAS) as ELISA coat antigens

Both acid-treated and sonicated periodate-oxidized hyaluronic acids with a d.o. of 10 percent, and Human Serum Albumin (HSA, Fluka) were dissolved in 0.5 ml of sodium phosphate buffer, pH 7.4. Sodium cyanoborohydride was added, and the mixtures incubated at 37 °C for 1 day. After conjugation was completed, sodium borohydride in 0.1 N NaOH was added to the reaction mixtures as described for the other conjugates to remove any remaining aldehyde. Conjugates were dialyzed and lyophilized.

Table 1: Physio-Chemical Characteristics of LMW-HA/Protein Conjugates:

Conjugates	Carrier	Mode of Fragment	PS d.o.	% HA In Conjugate
1	TT	Sonication	10	30
2	TT	Sonication	20	28
3	TT	Acid hydrolysis	10	31
4	TT	Acid hydrolysis	20	20
5	rPorB	Sonication	20	16

The hyaluronic acid and protein contents in the conjugates were measured by the carbazole (for uronic acids) (Bitter, T. 1962 *Anal. Biochem.* 4: 330) and coomassie (BioRad) assays respectively.

EXAMPLE 3

Isolation of the Hyaluronic-Acid Oligosaccharide Inhibitors

Hyaluronate lyase (EC 4.2.2.1) from *Streptomyces hyalurnolyticus* (Sigma Biochemicals), the content of 3 ampoules in 10 mM PBS, was added to sonicated hyaluronic acid (60 mg) and incubated at 37 °C for 1.5 hours. The reaction was stopped by boiling the reaction mixture at 100 °C for one minute in a water bath. The progress of the enzymatic digestion was monitored by removal of aliquots of the reaction mixture and analysis on a BIO-RAD system (Biologic) equipped with a Superdex® peptide column (Pharmacia), with 10 mM PBS as eluant at a flow rate of 0.75 ml/min. The solution was stored at 4 °C until further purification.

Isolation of the oligosaccharides was performed by anion-exchange

35

chromatography with a Mono-Q HR 5/5 column (Pharmacia) using a HPLC 1090 (Hewlett Packard 1090 Series II) system equipped with a diode-array detector, a programmable auto-injector, a fraction collector, and the Hewlett Packard Chemstation software program for system control and data acquisition/processing. A step-gradient of sodium chloride in Tris-HCL buffer was used for the separation. Two oligosaccharide fractions corresponding to a dimer (DP2) and a tetramer (DP4) eluting, respectively, between 18 to 26 minutes and between 28 to 31 minutes were collected, lyophilized and desalted using a Sephadex G-10 column (Pharmacia) and deionized water as eluant. The structure of the oligosaccharides was confirmed by examination of their ¹H-NMR spectra at 500 MHz. The DP2 oligosaccharide corresponded to Δ4,5-β-GlcU-(1,3)-D-GlcNAc, and the DP4 to Δ4,5-β-GlcU-(1,3)-β-D-GlcNAc-(1,4)-β-D-GlcU-(1,3)-β-D-GlcNAc.

EXAMPLE 4

Serological Studies: Immunospecificity of Rabbit Antisera to Low Molecular Weight Hyaluronic Acids (LMW-HAs)

Immunogenicity studies

New Zealand white rabbits were immunized subcutaneously, 3 times at 21 day intervals (days 0, 21, and 41) with 10 μg conjugated polysaccharide per dose of LMW-HA/TT in Freund's complete adjuvant for the first dose and incomplete Freund's adjuvant for the second and third doses. Rabbits were ear bled at days 21, 31 and 41 and a cardiac puncture test was performed 10 days after the third immunization.

Titration of Rabbit Antisera on LMW-HA/HSA Coated Plates

Microtiter plates (NUNC Polysorp) were passively coated with either sonicated LMW-HA/HSA or acid hydrolyzed LMW-HA/HSA conjugate (approximately 25 ng PS in 100 μL/well) diluted in PBS (50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH = 7.4) for one hour at 37

°C. After washing the plates with PBS + 0.05% Tween® 20 (PBS Tween, pH = 7.4), the plates were post-coated with 150 µL/well PBS + 0.1% Bovine Serum Albumin (PBS + BSA, pH 7.4) for one hour at room temperature. After the post-coat, the plates were again washed and stored at 2-8 °C until used.

Rabbit antisera were diluted serially in PBS Tween in wells of microtiter plates coated with either sonicated LMW-HA/HSA or acid hydrolyzed LMW-HA/HSA to a final volume of 100 µL/well and incubated for one hour at room temperature. The plates were washed with PBS Tween and 100 µL of a goat anti-rabbit IgG-Horseradish Peroxidase conjugate (Kirkgaard and Perry Laboratories) diluted 1:2,500 in PBS Tween was added to each well. Following a one-hour incubation at room temperature, the plates were again washed and 100 µL of TMB Substrate Solution (KPL) was added to each well. The plates were incubated for five to ten minutes at room temperature and color development was stopped by the addition of 100 µL of One Component Stop Solution (KPL) to each well. The optical density of each well was read at 450 nm, and titration curves were generated for each condition.

Inhibition of Binding of Rabbit Antisera to Sonicated LMW-HA/TT on LMW-HA/HSA Coated Plates

Microtiter plates were coated as above. Rabbit anti-sonicated LMW-HA/TT antisera were titred on plates coated with sonicated LMW-HA/HSA conjugate. The dilution corresponding to approximately one-half of the maximum signal was chosen as appropriate for the inhibition studies. The rabbit antisera were diluted into PBS Tween. Inhibitors were serially diluted in buffer containing the dilute antisera in Titer tubes® (Bio-Rad) and 100 µL of each sample were taken from the Titer tubes® and added directly to wells of coated microtiter plates. Samples were incubated in the microtiter plates for one hour at room temperature. The microtiter plates were washed with PBS Tween, then 100 µL of goat anti-rabbit IgG-HRP

conjugate (KPL) diluted 1:2,500 in PBS Tween were added to each well. The plates were incubated for one hour at room temperature, and washed with PBS Tween. 100 μ L of TMB Substrate Solution (KPL) was added to each well. The plates were incubated at room temperature for five to ten minutes and color development was stopped with the addition of 100 μ L to each well of One Component Stop Solution (KPL), and the absorbance at 450 nm was read. Inhibition was determined as percent of maximum signal achieved with dilute antiserum in the absence of any inhibitor.

Immune Response of New Zealand White Rabbits

Eight New Zealand White rabbits were immunized with three subcutaneous injections of either sonicated Hyaluronic Acid-Tetanus Toxoid (LMW-HA/TT) or acid hydrolyzed Hyaluronic Acid-Tetanus Toxoid (LMW-HA/TT) conjugates (four animals for each conjugate). Figure 4 displays the immune response for each individual rabbit for the sonicated LMW-HA/TT conjugate immunogen. All four animals responded to the hyaluronic acid with ELISA titers in excess of 50,000. Figure 5 shows the immune response for the individual rabbits immunized with acid hydrolyzed LMW-HA/TT conjugate. All four individual animals responded to the hyaluronic acid with ELISA titers of approximately 10,000, or greater.

The immune response of the rabbits was demonstrated to be specific depending on the nature of the conjugate used for the immunizations. Figure 6 shows that antibodies from animals that were immunized with the sonicated LMW-HA/TT conjugate generally reacted more readily to plates coated with sonicated LMW-HA/HSA, rather than acid hydrolyzed LMW-HA/HSA. There is at least an order of magnitude difference in the immunoreactivity between these different coating antigens. The converse holds true for the animals immunized with the acid hydrolyzed LMW-HA/TT conjugate. Figure 7 shows an order of magnitude preference for

38

these antisera to the acid hydrolyzed LMW-HA/HSA conjugate as opposed to the sonicated LMW-HA/HSA solid phase.

Specificity of Antisera Generated by Sonicated LMW-HA/TT in New Zealand White Rabbits.

Specificity of antisera produced in rabbits by immunization with the sonicated LMW-HA/TT conjugate was examined by microtiter plate inhibition studies. Results of inhibition studies using antisera from rabbit #75295 immunized with sonicated LMW-HA/TT are represented in Figures 8 and 9. Figure 8 indicates several species of sonicated HA as well as several species of acid hydrolyzed HA used as inhibitors. In this experiment, all forms of the acid hydrolyzed HA were poor inhibitors of antibody binding to the coated sonicated LMW-HA/HSA. Regarding the sonicated species of the inhibitors, the trend appears that the smaller the HA fragment produced by sonication, the more efficient that fragment is as an inhibitor. This indicates that the smaller HA molecules present more epitopes per unit mass than the larger species.

The results presented in Figure 9 further elucidate this finding. Herein, the very high molecular weight native HA is seen as a very poor inhibitor, almost three orders of magnitude less than the 20 kD HA used as the immunogen. Smaller species were also used as inhibitors in this experiment. The tetrasaccharide form of HA was a relatively efficient inhibitor, while the disaccharide and D-glucuronic acid forms did not inhibit the antibody binding to the solid phase at all.

Results from inhibition studies performed using antiserum from rabbit #72700, which was also immunized with the sonicated LMW-HA/TT conjugate, are presented in Figures 10 and 11. These results are quite similar to those obtained from rabbit #75295 as previously described. Figure 10 displays results similar to those seen in Figure 9. That is, the

tetrasaccharide form of the HA and the sonicated (20K) immunogen form of the HA inhibit well, while the disaccharide and native forms of HA inhibit poorly. The relationship between the size of the HA and immunoreactivity was further examined using a hexasaccharide form of HA. These results are shown in Figure 11. The results indicate that this form of HA is capable of complete inhibition of antibody binding. From these studies it is apparent that at least the tetrasaccharide form (two repeating subunits) of HA is necessary for complete inhibition. The disaccharide form of HA is insufficient for inhibition and that the native form of the molecule is not an optimal inhibitor. Therefore, a reduction in the size of the large native HA molecule is preferable for immune recognition.

EXAMPLE 5

Immunogenicity Studies in Mice

Antisera Produced in Mice to Hyaluronic Acid-Protein Conjugates

Both BALB/c and CD1 mice were immunized with three injections of LMW-HA/protein conjugate vaccines. The conjugates were either sonicated LMW-HA/TT, as with the rabbits, or sonicated HA conjugated to rPorB (LMW-HA/rPorB). The LMW-HA/TT conjugate vaccine produced no immune response greater than that of the negative control. However, the LMW-HA/rPorB conjugate produced measurable ELISA titers in 100% of the animals immunized. These data are shown in Figures 12 and 13 for BALB/c mice and CD1 mice, respectively.

EXAMPLE 6

Protection Experiments

Passive Immunization

Rabbit antisera to LMW-HA/TT conjugates were used for protection assay in passive immunization in adult Balb/c mice. The rabbit antisera (0.5 ml) diluted by half in sterile

40

PBS was injected intraperitoneally (IP) two hours before challenge (IP) with a LD90 challenge dose of group A streptococcus (GAS) type 6 or type 3. The antisera of a rabbit immunized with phosphate buffer saline (PBS) and complete Freund's adjuvant (CFA) as well as a rabbit antiserum raised against the group A streptococcal carbohydrate conjugated to tetanus toxoid were included in the protection experiment as control sera. Survival was followed for 10 days after challenge.

The LD90s were previously determined after immunization of Balb/c mice with rabbit antisera immunized with PBS/CFA followed 2 hours later by an IP challenge with a range of doses of GAS type 6 or type 3. The LD90 for GAS type 6 and type 3 was determined to be respectively 5×10^3 and 2×10^3 cfu /mL. The results of the challenge experiments are shown in Figures 14 and 15.

We claim:

1. An immunogenic conjugate molecule comprising hyaluronic acid covalently bound to an immunologically-suitable polypeptide carrier.
2. The immunogenic conjugate according to claim 1, wherein greater than about 50% of the hyaluronic acid molecules possess a nonreducing terminal glucuronic acid and/or unsaturated glucuronic acid residue.
3. The immunogenic conjugate according to claim 2, wherein the hyaluronic acid is a low molecular weight hyaluronic acid with a molecular weight of about 400 Kd or less and a molecular weight of about 600 daltons or more.
4. The immunogenic conjugate according to claim 3, wherein at least 90% or greater of the low molecular weight hyaluronic acid fragments possess a nonreducing terminal glucuronic acid and/or unsaturated glucuronic acid residue.
5. The immunogenic conjugate according to claim 3, wherein at least 95% or greater of the low molecular weight hyaluronic acid fragments possess a nonreducing terminal glucuronic acid and/or unsaturated glucuronic acid residue.
6. The immunogenic conjugate according to claim 3, wherein at least 98% or greater of the low molecular weight hyaluronic acid fragments possess a nonreducing terminal glucuronic acid and/or unsaturated glucuronic acid residue.
7. The immunogenic conjugate according to claim 3, wherein at least 99% or greater of the low molecular weight hyaluronic acid fragments possess a nonreducing terminal glucuronic acid and/or unsaturated glucuronic acid residue.

8. The immunogenic conjugate according to claim 3, wherein the low molecular weight hyaluronic acid is about at least about 4 glycosyl residues in size.
9. The immunogenic conjugate according to claim 3, wherein the low molecular weight hyaluronic acid possess about 2 to about 20 disaccharide subunits.
10. The immunogenic conjugate according to claim 9, wherein the low molecular weight hyaluronic acid is about 2 to about 10 disaccharide subunits.
11. The immunogenic conjugate according to claim 3, wherein the polypeptide carrier is selected from the group consisting of tetanus toxoid, diphtheria toxoid, pertussis toxoid, an immunogenic polypeptide derived from streptococci, an immunogenic polypeptide derived from influenza, an immunogenic polypeptide derived from meningococci, an immunogenic polypeptide derived from pneumococci, and an immunogenic polypeptide derived from *E. coli*.
12. The immunogenic conjugate according to claim 3, wherein the polypeptide carrier is a porin from *Neisseria*.
13. The immunogenic conjugate according to claim 3, wherein the conjugate is directly linked.
14. The immunogenic conjugate according to claim 3, wherein the conjugate elicits antibodies that bind an epitope comprising glucuronic acid or unsaturated glucuronic acid as the nonreducing terminal sugar of a low molecular weight hyaluronic acid.
15. The immunogenic conjugate according to claim 3, wherein the conjugate elicits

antibodies that bind capsular hyaluronic acid present in bacteria.

16. The immunogenic conjugate according to claim 15, wherein the bacteria is group A streptococci or group C streptococci.
17. A pharmaceutical composition comprising the conjugate according to claim 3 and a pharmaceutically acceptable carrier.
18. The pharmaceutical composition according to claim 17, further comprising a physiologically acceptable adjuvant.
19. A method of preparing a low molecular weight hyaluronic acid – polypeptide conjugate molecule comprising covalently linking low molecular weight hyaluronic acid fragments to an immunologically-suitable polypeptide, wherein about 50% or greater of the low molecular weight hyaluronic acid fragments have a glucuronic acid and/or an unsaturated glucuronic acid residue at the nonreducing terminal.
20. The method according to claim 19, wherein the method comprising covalently linking a low molecular weight hyaluronic acid to an immunologically-suitable polypeptide comprises reductive amination.
21. A purified antibody which binds to the immunogenic conjugate molecule according to claim 3.
22. The purified antibody according to claim 21, wherein the low molecular weight hyaluronic acid fragments are at least about 4 glycosyl residues in size.
23. The purified antibody according to claim 22, wherein the hyaluronic acid fragments are at

least about 4 glycosyl residues and no more than about 40 kD in size.

24. A pharmaceutical composition effective for treating or inhibiting group A streptococcal or group C streptococcal infection comprising an antibody selected from the group consisting of an antibody elicited by the composition according to claim 17, an antibody according to 21, or an antibody elicited by low molecular weight hyaluronic acid conjugated to a liposome.
25. A method of eliciting an antibody response in a mammal, said method comprising the step of administering to the individual mammal an amount of a pharmaceutical composition according to claim 17 in an amount which is sufficient to elicit an antibody response.
26. The method according to claim 25, wherein the mammal is a human.
27. The method according to claim 25, wherein the pharmaceutical composition is administered intramuscularly, subcutaneously, intraperitoneally or intravenously.
28. The method according to claim 25, wherein the pharmaceutical composition is administered in an amount of about 0.1 to about 50 micrograms per kilogram body weight.
29. A vaccine that elicits effective levels of anti-low molecular weight hyaluronic acid antibodies in humans comprising the immunogenic conjugate according to claim 3.
30. A method of inhibiting streptococcal infection in a mammal, comprising administering to the mammal a pharmaceutical composition according to claim 3 in an amount sufficient

to inhibit infection.

31. A method of inhibiting progression of infection in a mammal by bacteria containing HA, comprising administering to the mammal a composition comprising the pharmaceutical composition according to claim 24 in an amount sufficient to inhibit progression of the infection.
32. The method according to claim 31, wherein the bacteria are group A streptococci or group C streptococci.
33. A diagnostic immunoassay kit for detecting infection by streptococci comprising an antibody according to claim 21.

CONJUGADOS INMUNOGÉNICOS DE ÁCIDO HIALURÓNICO DE BAJO
PESO MOLECULAR CON TOXINAS POLIPÉPTIDAS

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona con ácido hialurónico/moléculas de conjugado de polipéptido, y composiciones farmacéuticas que la comprenden. En particular la presente invención se relaciona con ácido, y más preferiblemente con ácido hialurónico de bajo peso molecular (LMW-HA), y LMW-HA/moléculas de conjugado de polipéptido que elicitán anticuerpos al ácido hialurónico que tiene reacción cruzada con estreptococos tanto del grupo A como del grupo C. las moléculas de la invención y las composiciones farmacéuticas que las comprenden son útiles para el tratamiento y prevención de la infección y para el diagnóstico de enfermedad causada por estreptococos del grupo A y el grupo C.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El ácido hialurónico (HA) es un glicosaminoglican de ocurrencia natural. Este está hecho de unidades repetidas de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico. Ver figura 1. El HA se presenta en tejido animal, por ejemplo, fluido espinal, fluido ocular, fluido sinovial, piel, y también en algunos estreptococos, tales como en las cápsulas de los estreptococos del grupo A y el grupo C. Tal mucoide o cepas altamente encapsuladas de los estreptococos del grupo se han asociado tanto con infecciones inusualmente severas, como con fiebre reumática aguda (Johnson et al, 1992, J. Infect. Dis. 166:374-382). Las infecciones de tejido suave invasivas en humanos causadas por estreptococos del grupo A y el grupo C están asociadas con morbilidad y mortalidad significativa. Los estreptococos del grupo C también están asociados con faringitis y artritis reactiva. Además, las infecciones de los estreptococos del grupo C son prevalentes en los caballos.

La morfología de la colonia mucoide de los estreptococos del grupo A y el grupo C es el resultado de producción abundante de polisacárido capsular compuesto

de ácido hialurónico. La cápsula de ácido hialurónico del estreptococos del grupo A se ha mostrado recientemente por exhibir un número importante de papeles en la patogenicidad de estos organismos. Entre otras cosas, las cápsulas de HA protegen los estreptococos mucoides del grupo A de la fagocitosis y tienen un importante papel en la virulencia Wessels et al. 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8317-21; Dale et al. 1996, *Infect. Immunol.* 64:1495-501; y Moses et al. 1997 *Infect. Immunol.* 65, 64-72. Además, las cápsulas de HA modulan la adherencia mediada por proteína X y actúan como un ligando para la unión de los estreptococos del grupo A al CD44 sobre queratinocitos humanos. La cápsula HA de los estreptococos del grupo A son tanto altamente conservadas como dispuestas a la superficie lo que indica que HA pueda servir como un sitio de adhesión universal para la unión de otras cepas de bacterias a la mucosa faríngea y a la piel (Schrager et al 1998, *J. Clin. Invest.* 101:1708-16).

Evitar y tratar las infecciones de patógenos gram positivos tales como los estreptococos es particularmente importante en el desarrollo de las cepas resistentes que son tanto difíciles de tratar como difíciles de erradicar

una vez establecidas. Aunque la conjugación de antígeno de polisacárido, o de haptenos de carbohidrato inmunológicamente inertes, a antígenos dependientes de timo (TD) tales como proteínas mejoran su inmunogenicidad, no era evidente si tal respuesta inmunogénica elicited contra HA proporcionaría protección contra bacterias que contienen HA, tales como estreptococos del grupo A o del grupo C. Además, la presencia de HA tanto en tejido de mamíferos como en estreptococos complica el desarrollo del HA como un antígeno de carbohidrato para tratar o evitar la infección de estreptococos en razón de un potencial para elicitar una respuesta autoinmune dirigida al tejido huésped.

Hasta hace poco, el HA se creía que era una molécula no inmunogénica (Meyer, 1936, J. Biol Chem. 114:689 y Humphreys, 1943, Biochem J. 37:460). Sin embargo, estudios más recientes indican que los anticuerpos de ocurrencia natural al HA están presentes en varias especies (Underhill, 1982, Biophys. Res. Commun. 108:1498). Fillit et al. indujo anticuerpos a HA en ratones con HA unidos a liposomas. Ellos reportaron que el HA es inmunogénico e identificaron dos determinantes

antigénicos sobre la molécula. Fillit et al también notaron que el modo de presentación del HA sobre el liposoma es importante para su inmunogenicidad. Finalmente, Fillit et al reportaron que un anticuerpo de HA obtenía reacción cruzada con sulfato de heparan y que tal reacción cruzada podría estar involucrada en patogénesis de tejido de enfermedad vascular autoinmune (Fillit et al; 1988, J. Exp. Med. 168:971-982. Basado en los reportes resumidos anteriormente, permanecía impredecible si el HA o los conjugados de HA elicitarían una respuesta inmune útil para inhibir o tratar infección de bacterias que contenían HA tales como estreptococos del grupo A o del grupo C.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención suministra una composición inmunogénica que comprende HA y LMN-HA conjugada a un polipéptido o a un portador de proteína. Las moléculas de conjugado de la presente invención son útiles para elicitar anticuerpos que tienen reacción cruzada con bacterias que contienen HA, tales como estreptococos del grupo A y del grupo C. Las moléculas de conjugado de la presente invención y las composiciones farmacéuticas que

las comprenden son útiles en un método para el tratamiento y diagnóstico de infección y enfermedad causada por tales bacterias, incluyendo estreptococos del grupo A y del grupo C.

Los solicitantes han descubierto de manera sorprendente que los conjugados de LMW-HA son inmunogénicos en mamíferos. Aún más sorprendentemente los solicitantes descubrieron que los anticuerpos elicitados por los conjugados de la presente invención tienen reacción cruzada con los estreptococos del grupo A y del grupo C pero tienen solo una mínima reacción cruzada con HA nativo asociado con tejido de mamífero.

Los métodos para conjugar LMW-HA a polipéptidos incluyen aminación reductiva, tratamiento con bromuros cianógeno, formación unida de amida entre un grupo amino libre sobre el portador y una porción carboxilato sobre el LMW-HA, o mediante el uso de una molécula ligadora. La invención suministra composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas conjugadas de LMW-HA y el uso de estas composiciones para elicitar anticuerpos para el tratamiento de infección mediante bacterias que contienen HA tales como estreptococos del grupo A y del grupo C,

como vacunas, y para diagnósticos. Cualquier polipéptido que convierta una respuesta independiente de los carbohidratos de células T a una respuesta dependiente de células T es adecuado para uso como un portador. Ejemplos son toxinas o toxoides tales como toxoide del tétano, o toxoide de la difteria o toxina pertussis o toxoide, neisserial poríns, por ejemplo PorA de gonococos, y Por>B de meningococos.

La presente invención también suministra composiciones farmacéuticas, vacunas y otros reactivos inmunogénicos derivados de los conjugados de polipéptido LMW-HA inmunogénico.

La invención está además dirigida a un método para inmunizar un mamífero contra infecciones bacterianas. El método comprende administrar una cantidad efectiva de una composición farmacéutica de la invención a un mamífero para detener la infección de un organismo que causa enfermedad. Los métodos son útiles para evitar y tratar infecciones por bacterias que contienen HA, tales como los estreptococos del grupo A y del grupo C.

La invención también proporciona un método para elicitar anticuerpos en mamíferos, preferiblemente humanos, con los conjugados de polipéptido de LMW-HA de la invención. La invención también suministra una composición de inmunoglobulina y un anticuerpos aislado que son elicitados en respuesta a la inmunización de un mamífero que utiliza los conjugados de polisacárido .. polipéptido de la invención. Tal inmunoglobulina y anticuerpo aislado es útil como agente terapéutico y como reactivo de diagnóstico.

Las inmunoglobulinas y los anticuerpos producidos son específicos para LMW-HA. Las moléculas de conjugado de la invención también son útiles para elevar los anticuerpos monoclonales y antiidiotípicos de acuerdo con métodos bien conocidos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Estructura de ácido hialurónico (HA).

Figura 2: Generación de LMW-HA antigénico de bajo peso molecular mediante sonicación y/o tratamiento ácido.

Figura 3: Estructura del epitopo protector del estreptococo; a) tetrasacárido de HA sonificado; b) tetrasacárido generado después de la acción de la hialuronidasa.

Figura 4: Títulos de ELISA de antisueros de conejo a conjugados de HA-TT sonificado.

Figura 5: Títulos ELISA de antisueros de conejo a conjugados LMW-HA/TT hidrolizado ácido.

Figura 6: Titulación de antisueros de conejo a conjugado de LMW-HA/TT sonificado.

Figura 7: Titulación de antisueros de conejo a conjugado LMW-HA/TT hidrolizado ácido.

Figura 8: Inhibición de antisuero de conejo No. 75295 con HA hidrolizado ácido, HA sonificado, y conjugado de HA sonificado sobre platos recubiertos con LMW-HA/HSA.

Figura 9: Inhibición de antisuero de conejo No. 75295 con HA sonificado, HA nativo, ácido D-glucurónico,

disacárido de HA, y tetrasacárido de HA sobre platos recubiertos con LMW-HA/HSA.

Figura 10: Inhibición de antisuero de conejo No. 72700 con HA sonificado, HA nativo, ácido D-glucurónico, discárido de HA, y tetrasacárido de HA sobre platos recubiertos con LMW-HA/HSA.

Figura 11: Inhibición de antisuero de conejo No. 72700 con HA sonificado, HA nativo, discárido de HA, tetrasacárido de HA, y hexa/octosacárido de HA sobre platos recubiertos con LMW-HA/HSA.

Figura 12: Títulos ELISA de antisuero de ratón BALB/c a conjugado LMW-HA/rPorB.

Figura 13: Títulos ELISA de antisueros de ratón CD1 a conjugado LMW-HA/rPorB.

Figura 14: Inmunización pasiva de ratones BalB/c con antisueros de conejo; inoculación con GAS tipo 6 (4.400 cfu/ml). Respectivamente, ∇ antisueros de conejo contra PBS/CFA; ○ antisueros de conejo contra LMW-HA/TT

sonicado; O antisueros de conejo contra LMW-HA/TT
 sonicado; V antisueros de conejo contra LMW-HA/tt
 sonicado.

Figura 15: Inmunización pasiva de ratones BalB/c con
 antisueros de conejo; inoculación con GAS tipo 3 ($2,5 \times 10^5$ cfu/ml). Respectivamente, V antisueros de conejo
 contra PBS/CFA; O antisueros de conejo contra LMW-HA/TT
 sonicado; O antisueros de conejo contra LMW-HA/TT
 hidrolizado ácido; V antisueros de conejo contra LMW-
 HA/tt sonicado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El ácido hialurónico se utiliza como inmunógeno para
 elevar una respuesta protectora y/o terapéutica. En
 particular, el HA es útil para elevar una respuesta
 inmune que tenga reacción cruzada con bacterias tales
 como estreptococos del grupo A y del grupo C que tengan
 HA sobre su superficie. Sin estar ligados a la teoría, se
 cree que el epítipo de reacción cruzada con los

estreptococos del grupo A y del grupo C tienen aproximadamente 3 o 4 residuos de longitud y está localizado en el terminal no reductor. No parece existir diferencia significativa en si el residuo de ácido glucurónico terminal no reductor es saturado o no saturado en razón a que ambos epítopos son protectores. Además, parece que el ácido glucurónico terminal se convierte en ácido glucurónico insaturado en la sangre y otros fluidos del cuerpo. El HA puede terminar en un glucosaminilo o residuo glucuronilo, la respuesta inmune es mejorada cuando el porcentaje de ácido glucurónico o ácido glucurónico insaturado en el terminal no reductor de HA se incrementa sobre el porcentaje de N-acetil glucosamina.

Aunque el HA nativo se puede utilizar para preparar conjugados de acuerdo con esta invención, preferiblemente el LMW-HA que tiene desde aproximadamente 3 a 4 sacáridos a aproximadamente 2.000 sacáridos o desde aproximadamente 600 Daltons a aproximadamente 400 Kd en tamaño se utiliza para preparar conjugados. Más preferiblemente, el LMW-HA tiene aproximadamente 4 sacáridos o dos unidades repetidas a aproximadamente 100 unidades repetidas o aproximadamente 800 Daltons a aproximadamente 40 Kd de

tamaño. Un tamaño más preferido para el LMW-HA es aproximadamente 4 unidades repetidas a 10 o a aproximadamente 20 unidades repetidas o aproximadamente 800 Daltons a aproximadamente 4 a 8 Kd. El LMW-HA se puede obtener de HA nativo, el cual típicamente tiene un peso molecular de 400 Kd a varios millones de Daltons (disponible de Sigma o mediante purificación de acuerdo con la patente estadounidense No. 4,141,973), mediante varios métodos que incluyen sonicación (Kubo K; et al. Glycoconj J., 1993, 10(6):435, o mediante métodos químicos (Blatter G, Carbohydr. Res. 1996, 288:109-125 y Hulkes K. M. Carbohydr. Res. 1998, 309: 161-164) y/o enzimáticos (DeLaca et al. J. Am. Chem. Soc. 1995 117:5869-5870).

La invención también proporciona moléculas de LMW-HA que contienen residuos de ácido glucurónico en el terminal no reducido. Un método para obtener fragmentos de HA terminal de ácido glucurónico es mediante sonicación del HA nativo de acuerdo con el método de Kubo K; et al. Glycoconj J., 1993, 10(6):435. El porcentaje de moléculas con terminal de ácido glucurónico se puede incrementar mediante tratamiento del producto de sonicación con exo-beta-acetil glucosaminidasa para

remover cualquier residuo N- acetilglucosaminilo terminal no reductor y proporcionar LMW-HA con un porcentaje más alto de residuos glucuronilo en el terminal no reductor de las moléculas. Un método alternativo para obtener LMW-HA incluye tratar HA nativo bajo condiciones ácidas medias para generar moléculas que contienen una mezcla de N-acetil glucosaminilo y residuos glucuronilo en sus extremos no reductores. Los grupos glucosaminilo no reductores terminales sobre el LMW-HA despolimerizado ácido se pueden remover con un exo- β -acetil glucosamidasa para suministrar LMW-HA con residuos glucuronilo en el terminal no reductor de las moléculas. Ver figura 2. Ver figura 2. La invención también suministra moléculas LMW-HA que contienen residuos de 4,5-glucuronilo insaturado en el terminal no reductor. Ver figura 3. Un método para obtener fragmentos HA terminados en 4,5-glucuronilo insaturado es mediante el tratamiento de HA nativo con hialuronidasa.

El LMW-HA para uso con la presente invención consiste de fragmentos en donde al menos aproximadamente el 90% de los fragmentos LMW-HA tienen ácido glucurónico o ácido glucurónico insaturado en su terminal no

reducido. Preferiblemente, al menos aproximadamente 95% de los fragmentos LMW-HA para uso con la invención tienen un ácido glucurónico o un ácido glucurónico insaturado en su terminal no reducido.

Cuando se utiliza sonicación, el HA nativo se puede disolver en un solvente adecuado, tal como solución salina amortiguada con fosfato, y se obtiene la solución sonicada hasta la cantidad deseada de despolimerización. Ver, por ejemplo, Kubo et al. Glycoconj J., 1993, 10:435. El LMW-HA obtenido mediante tal tratamiento preferiblemente tiene el peso molecular de aproximadamente 10 - 20 kd y contiene principalmente residuos glucurónicos en su extremo terminal no reducido, es decir mayor de 95%.

Además, los fragmentos LMW-HA que contienen una mezcla de residuos N-acetilglucosamidino y glucuronilo o sus extremos no reducidos se pueden obtener mediante tratamiento de HA bajo condición ácida media. Aproximadamente el 50% de los fragmentos LMW-HA obtenidos por este método tienen ácido glucurónico en su terminal no reducido. La subsecuente al tratamiento al tratamiento ácido, los grupos glucosaminilo no reducidos terminales

pueden ser selectivamente removidos de los fragmentos con un exo- β -N-acetil glucosaminidasa (disponible de Sigma) para exponer los residuos glucurónico en el extremo terminal de las moléculas. Al variar las funciones de reacción, el porcentaje de fragmentos con grupos glucosamínico no reducidos terminales pueden ser controlados. Por ejemplo, la reacción se puede detener al interrumpir la enzima con calor o pH en varios puntos de terminación para obtener el porcentaje deseado de fragmentos con ácido glucurónico en su terminal no reducido.

Además, el LMW-HA con cualquiera del N-cetil- β -D-glucosamina o el ácido β -D-glucurónico en el extremo productor puede ser químicamente sintetizado mediante métodos conocidos en la técnica. Ver Blatter G. Carbohydr. Res. 1996, 288:109 - 125 y Halkes K. M. Carbohydr. Res 1998, 309:161-164. Por ejemplo, un disacárido de ácido glucosamina - glucurónico adecuadamente protegido puede primero ser preparado de los monosacáridos correspondientes. Los monosacáridos se pueden acoplar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mediante el uso de un α -

tricloroacetamidoglucopiranosa como el donador glicosil. El disacárido resultante puede entonces ser acoplado repetidamente consigo mismo para formar LYW-HA de tamaño variable. Por ejemplo, el grupo protector anomérico sobre la porción de ácido glucurónico de disacárido puede ser removido selectivamente. Un grupo protector preferido para esta posición es el grupo 4-metoxifenilo. Para el disacárido del extremo reductor, es decir el primer aceptador glicosilo, en la posición anomérica se puede convertir a una porción metoxi, por ejemplo, al primero convertir el grupo 4-metoxifenilo a hidroxilo anomérico mediante tratamiento con nitrato de amonio cármico. El grupo hidroxilo anomérico resultante se puede convertir a una porción α -tricloroacetamidato mediante tratamiento con tricloroacetronitrilo y DBU. La porción α -tricloroacetamida se puede convertir a la porción metoxi mediante el tratamiento con metanol anhidro seguido por el tratamiento con el trimetilsililtriflato y trimetilamina. Para se utilizados los disacáridos como donadores de glicosilo, la posición anomérica se puede convertir a la porción α -tricloroacetamidato como se describió anteriormente. El disacárido metoxi protegido descrito anteriormente se puede aceptar como un aceptador

glicosilo después de remover selectivamente el grupo protector en la posición 3 del residuo glicosamina. Un grupo protector preferido para esta posición es el grupo cloroacetilo que se puede remover con tratamiento con tiourea dipiridina en etanol. El donador disacárido se puede acoplar al aceptador de una manera interactiva para producir LMW-HA, es decir cada acoplamiento sucesivo produce LMW-HA con una unidad repetida adicional. Los grupos protectores preferidos adicionales para el residuo de glucosamina son un grupo 4,6-O-benzilidano y un grupo 2-N-tricloroacetamido. Los grupos protectores adicionales preferidos para el residuo de ácido glucurónico son los grupos 6- y 4-O-benzilo y un éster de metilo C6. El uso de estos y grupos protectores alternativos se describe en "Protective Groups In Organic Synthesis", segunda Ed., por T.W. Greene y P.G.M. Wuts, 1991, John Wiley & Son Inc., que se incorpora aquí como referencia.

Los fragmentos HA también se pueden sintetizar esquemáticamente utilizando azúcares de difosfato de uridina y sintetasa HA. Ver, por ejemplo, De Luca et al. J. Am. Chem. Soc. 1995 117:5869-5870. Estos dos últimos métodos permiten la síntesis de LMW-HA que tiene cualquier porcentaje de ácido glucurónico en su terminal.

Así, la formulación de LMW-HA mediante degradación enzimática, síntesis enzimática o mediante síntesis química permite la producción de más de aproximadamente 99% o más de aproximadamente 99% de fragmentos LMW-HA que tiene un ácido glucurónico o un ácido glucurónico insaturado en su terminal no reductor.

El LMW-HA se puede acoplar a un portador mediante los métodos conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Dick and Beurret in *Conjugate Vaccines*, Cruse et al. eds., *Contrib. Microbiol. Immunol.*, Basel, Karger, 1989, vol. 10, pp48-114 y Jennings and Sood en *Neoglycoconjugates: Preparation and Applications*, Lee et al. eds., Capítulo 10, pp 325-371, 1994, Academic Press, San Diego. Los métodos incluyen aminación reductiva, acoplamiento a través de porción de carboxilato el uso de ligadores y el uso de bromuro cianógeno o sus derivados. Cuando se conjuga LMW-HA a un portador, es preferible evitar la alteración del epitopo en el extremo no reductor del polisacárido. Un método preferido de conjugación LMW-HA a un portador es mediante conjugación directa tal como aminación reductiva en el sacárido terminal reductor. Por ejemplo, un grupo de extremo terminal reductor puede ser introducido selectivamente en

el LMW-HA mediante reducción del residuo terminal reductor con, por ejemplo un borohidruro, seguido por oxidación de periodato y amidación reductiva. Ver, por ejemplo, Jennings patente estadounidense No. 4,356,170.

Los métodos que conjugan LMW-HA a un portador en varios sitios a lo largo del esqueleto del LMW-HA se pueden utilizar. Por ejemplo, el LMW-HA se puede activar mediante el uso de periodato para generar grupos aldehído en los residuos del esqueleto de los polisacáridos y el LMW-HA activado es luego tratado por un portador que contiene un grupo amino libre en la presencia de un agente reductor tal como borohidruro. Estos métodos también permiten la conjugación de más de una molécula portadora en un LMW-HA simple que permite la reticulación.

El componente de polipéptido de las moléculas de conjugado de la invención puede ser cualquier proteína fisiológicamente tolerada o polipéptido que evoca una respuesta dependiente de célula T cuando se acopla a LMW-HA. El término polipéptido pretende ser un término genérico que incluye péptidos, polipéptidos y proteínas que incluyen proteínas modificadas o recombinantes.

Ejemplos de polipéptidos útiles como portadores incluyen, pero no están limitados a, toxinas bacterianas, toxoides, purinas, proteínas de membrana exterior, y materiales de proteína de reacción cruzada. Tales polipéptidos incluyen, pero no están limitados a, toxoide de tétano, toxoide de difteria, toxoide pertussis y un polipéptido inmunogénico derivado de estreptococo, un polipéptido inmunogénico derivado de influenza, un polipéptido inmunogénico derivado de meningococo, y un polipéptido inmunogénico derivado de neumococo, y un polipéptido inmunogénico derivado de E. Coli. En particular, el toxoide de tétano, el toxoide de difteria, el CRM₁₁₇, y los polipéptidos de porina de hemophilus, E. coli y neisseria, tal como rProB, son preferidos. Ver por ejemplo patente estadounidense No. 5,439,808.

La molécula conjugada preparada de acuerdo con la presente invención comprenden típicamente un polipéptido portador o una proteína a la cual se une al menos un fragmento de ácido hialurónico de bajo peso molecular a través de un sitio de unión simple en el extremo terminal del esqueleto del fragmento polisacárido. Así, la presente invención suministra la capacidad, si se desea de producir moléculas de conjugado hialurónico de bajo

peso molecular en donde el componente polisacárido, excepto para un extremo, no es oscurecido por el portador. Estos tipos de conjugados se pueden denominar como neoglicoproteínas. Ver, por ejemplo, Dick and Beurret, *supra*. Alternativamente, los conjugados reticulados se pueden formar de acuerdo con la presente invención. Estos tipos de conjugados se pueden denominar como conjugados de enrejado. Ver, por ejemplo, Dick and Beurret, *supra*.

El índice molecular de LMW-HA a polipéptido o proteína en las moléculas de conjugado de la invención está preferiblemente entre aproximadamente 1 a aproximadamente 100 moléculas de LMW-HA por molécula, polipéptido o proteína. Más preferiblemente el índice está entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 moléculas LMW-HA o epitopos por molécula de polipéptido o proteína. Alternativamente, el índice de LMW-HA a polipéptido o proteína se puede determinar en peso, por ejemplo, las moléculas de conjugado de la invención están entre aproximadamente 10% y aproximadamente 500% en peso LMW-HA a polipéptido o proteína en peso. Preferiblemente, los conjugados de la presente invención son aproximadamente 30% a aproximadamente 100% en peso de

LMW-HA a polipéptido o proteína en peso. En una modalidad, un ácido hialurónico de muy bajo peso molecular, es decir, menos de aproximadamente 20 unidades repetidas, se utiliza para formar conjugados que incrementan la densidad del epítipo. Las variaciones en el LMW-HA/polipéptido o índice de proteína se puede lograr al ajustar las condiciones de conjugación, especialmente el índice de componentes de partida en la reacción de conjugación.

Además de suministrar moléculas de conjugado que comprenden ácido hialurónico de bajo peso molecular conjugados con polipéptido o proteína, la presente invención también comprende conjugados multivalentes y composiciones farmacéuticas y vacunas que comprenden conjugados multivalentes en donde diferentes polisacáridos son conjugados en un polipéptido simple. Por ejemplo, el ácido hialurónico de bajo peso molecular se puede unir a un polipéptido o proteína en varias combinaciones con otros polisacáridos. Ejemplos de tales polisacáridos son los polisacáridos capsulares de *Haemophilus influenzae* tipo b; *Streptococcus* grupo B tipo Ia, y Ib, II, III, IV, V, VI, y VIII; los grupos

meningococo A, B y C; y polisacárido de estreptococo grupo A.

Los conjugados inmunogénicos de acuerdo con la presente invención suministran composiciones farmacéuticas útiles, tales como vacunas, que son importantes para suministrar protección contra infección por bacterias que contienen HA, tales como los estreptococos del grupo A y grupo C, en mamíferos, particularmente humanos y caballos. Además, estas vacunas son útiles para la administración a hembras embarazadas como medio de suministrar anticuerpos protectores a un neonato antes de nacimiento.

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden utilizar como medios para elevar los anticuerpos monoclonales, policlonales, o antiidiotípicos útiles para propósitos profilácticos, terapéuticos y de diagnóstico. Los diagnósticos son particularmente útiles en el monitoreo y detección de varias infecciones y enfermedades causadas por bacterias que contienen HA tales como estreptococos del grupo A y el grupo C. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden utilizar como un inmunógeno para uso tanto en

protección inmunogénica activa como pasiva de aquellos individuos infectados o en riesgo de infección especialmente mediante estreptococos del grupo A o del grupo C. Los anticuerpos bactericidas utilizados para la protección pasiva y producidos mediante inmunización de un mamífero con cualquiera de las composiciones inmunogénicas de la invención y luego recuperación de anticuerpos bactericidas. Os anticuerpos bactericidas para uso con la presente invención pueden estar presentes en el suero, y fracción parcialmente purificada tal como fracción de gamaglobulina o anticuerpos purificados. Por ejemplo, el IgG se puede purificar de mezclas de proteína cruda, tales como fluido de suero o ascítico, mediante el uso de agarosa de proteína A o proteína G. la proteína A se une a la porción Fc del IgG. La proteína G también se une a la región Fc, pero también se puede unir a la región Fab haciéndola útil para purificación de los fragmentos F(ab)'; o IgGs. Las muestras crudas de IgGs se pueden purificar utilizando unas columnas de agarosa de proteína o proteína G. las muestras de suero, fluido ascítico o cultivo de tejido supernadante deben ser diluidas al menos 1:1 con amortiguador antes de aplicar a una columna. Después de aplicar a la muestra, la columna se lava con amortiguador lavado, por ejemplo, fosfato de

sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, hasta que la mayoría de las impurezas se remueve. El IgG es entonces eluido con amortiguador de elusión, por ejemplo, 100 ml de glicina, pH 3,0. El IgG puede ser entonces concentrado mediante diafiltración y purificado adicionalmente mediante intercambio iónico o cromatografía de exclusión de tamaño.

Los anticuerpos "humanizados" (incluyendo anticuerpos quiméricos e injertados CDR), fragmentos de anticuerpos, y especialmente anticuerpos bi-específicos basados en anticuerpos monoclonales reivindicados están dentro del alcance de la presente invención, en razón a que son productos relacionados con anticuerpos recombinantes producidos en células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden producir en cultivos mediante células huésped tales como E. coli, levadura, células de insecto y mamífero hasta la determinación de la información estructural (secuencia) para las regiones variables de los anticuerpos de la invención. También, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6,180,377. La información de secuencia para las regiones variables también posibilita la

preparación de anticuerpos injertados con CDR. Más aún, los anticuerpos quiméricos (por ejemplo anticuerpos de ratón/humano) se pueden preparar utilizando células de mieloma de ratón transformado o células de hibridoma y anticuerpos bi-específicos se pueden producir mediante células de hibridoma híbridos.

Las composiciones farmacéuticas y vacunas de la invención son típicamente formadas al dispersar ácido y/o conjugado hialurónico de bajo peso molecular en un portador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica, solución salina amortiguada con fosfato u otros líquidos inyectables. La composición o vacuna farmacéutica se puede administrar parenteralmente, por ejemplo subcutáneamente, intraperitonealmente, o intramuscularmente. Los aditivos de costumbre en composiciones farmacéuticas tales como vacunas también se pueden agregar; por ejemplo, estabilizadores, tales como lactosa o sorbitol, y adyuvantes tales como fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, sulfato de aluminio, monofosforil lípido A, monofosforil lípido A, QS21, o esteariltirosina. Tales composiciones farmacéuticas pueden comprender un ácido hialurónico de bajo peso molecular, su conjugado, o anticuerpos a ácido

hialurónico de bajo peso molecular y/o a su conjugado. Las composiciones se pueden administrar solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un adyuvante o un compuesto estabilizador que se puede administrar en un portador farmacéuticamente biocompatible estéril, que incluye, pero no está limitado a solución salina, solución salina amortiguada, dextrosa, y agua. Las composiciones se pueden administrar solas a un paciente, o en combinación con otros agentes, drogas, hormonas o modificadores de respuesta biológica.

Las composiciones farmacéuticas y las vacunas son administradas en cantidades suficientes para provocar una respuesta inmunogénica. Las dosis normalmente están en el rango de aproximadamente 0,1 a 50 μg de molécula de conjugado por kilogramo de peso de cuerpo. Las dosis se pueden ajustar con base en el tamaño, peso o edad del individuo y están bien dentro del nivel del experto en la técnica. Una serie de dosis se pueden dar para inmunidad óptima. La respuesta del anticuerpo en un individuo se puede monitorear al determinar el título del anticuerpo o la actividad bactericida y el individuo puede ser empujado, si es necesario, para mejorar la respuesta.

La presente invención suministra composiciones que comprenden anticuerpos, tales como anticuerpos purificados, reacciones de gamaglobulina y suero útil para proporcionar inmunidad pasiva a mamíferos infectados o en peligro de ser expuestos a bacterias que contienen HA, especialmente estreptococos del grupo A o el grupo C. Entre las muchas patologías causadas por los estreptococos está la infección de tejido suave invasiva que está asociada con morbilidad y mortalidad significativa, ver, por ejemplo, Ashbaugh et al. J. Clin. Invest., 1998, 102:550. Los IgGs, los fragmentos de anticuerpos, las fracciones de gamaglobulina, y el suero suministrado por la presente invención son útiles para inhibir prevenir infecciones provenientes de bacterias que contienen HA, tales como estreptococos del grupo A y el grupo C y, necrosis de tejido resultante y otras patologías resultantes de tal infección,. Las composiciones farmacéuticas que comprende el anticuerpo, tales como anticuerpos purificados, fracciones de gamaglobulina y suero son típicamente formadas al dispersar los anticuerpos en un portador farmacéuticamente aceptable adecuado, tal como solución salina fisiológica, solución salina amortiguada con

fosfato u otros líquidos inyectables. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar parenteralmente, por ejemplo subcutáneamente, intraperitonealmente o intramuscularmente. Los aditivos de costumbre en las composiciones farmacéuticas también se pueden agregar. Las composiciones se pueden administrar solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que se puede administrar en un portador farmacéutico biocompatible estéril, que incluye, pero no está limitado a solución salina, solución salina amortiguada, dextrosa y agua. Las composiciones se pueden administrar solas a un paciente, o en combinación con otros agentes, drogas, hormonas o modificadores de respuesta biológica.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos son administradas en cantidades suficientes para inhibir la infección de bacteria. Las dosis se pueden ajustar basadas en el tamaño, peso o edad del individuo y están bien dentro del nivel del experto en la técnica. Una series de dosis pueden ser dadas para inmunidad óptima. La respuesta de dosis en un individuo se puede monitorear al determinar el título del anticuerpo o la actividad bactericida y el individuo le

puede ser dadas dosis adicionales, si es necesario, para mejorar la respuesta.

Los anticuerpos preparados de acuerdo con la presente invención también son útiles varios inmunoreactivos para el uso en inmunoensayos. Por ejemplo, para inmunoensayos los fragmentos de ácido hialurónico de bajo peso molecular o sus conjugados pueden ser inmovilizados sea directamente o por medio de un aglomerante, tal como un enlazador de polipéptido, a un soporte sólido. Métodos similares a aquellos usados para hacer los conjugados pueden usarse para la inmovilización. Los anticuerpos pueden entonces ser usados en diversos sistemas de inmunoensayo conocidos por aquellos en la técnica incluyendo, ensayos de radioinmuno y ELISA para detectar la presencia de bacteria que contiene AHA, tal como los estreptococos de grupo A o grupo B. Tales ensayos pueden ser usados para diagnosticar la presencia de infección en individuos por medio de ensayar en cuanto a la presencia de los anticuerpos estreptococales de grupo A o grupo B en el suero u otros fluido del cuerpo.

Los ejemplos presentados aquí tienen el propósito de ejemplificar los diversos aspectos que lleva la invención

y no el propósito de limitar el alcance de la invención de ninguna manera. Toda las publicaciones, Patentes y artículos a los cuales se refiere en esta especificación se incorporan aquí en su totalidad dentro de la especificación.

EJEMPLO 1

Preparación del LMW-HA

Despolimerización del ácido hialurónico por Hidrólisis de Ácido.

El ácido hialurónico (100 mg, Lifecore lote 1-9062-5) fue agregado a una solución de 10 ml de HCL al 0,05 N. La mezcla fue calentada a 20°C durante 2 horas, no agitada para poder disolver el sólido entero. La muestra fue entonces calentada durante 1,5 horas a 100°C. La despolimerización fue monitoreada por la remoción de alícuotas de la mezcla de reacción a diferentes tiempos y analizadas sobre un sistema Bio-Rad (Biologic) equipado con una columna Superose® 12 HR 10/30 (Farmacia). La solución fue neutralizada con NaOH AL 0,5 N, luego dializada con una membrana Diaflo® de corte de peso

molecular 3,500 (MWCO) y liofilizada. El producto fue fraccionado a tamaño molecular por medio de una columna Superdex® 200 PG (Farmacia) para proporcionar 65 mg del producto sólido. El análisis ¹H-NMR de las muestras a 500 MHz confirmó la estructura de la unidad repetida de disacárido del ácido hialurónico (HA). El peso molecular promedio del fragmento generado fue estimado por cromatografía de exclusión de tamaño acoplada con una fotometría de barrido por luz de láser multiángulo (SEC MALLS) que es de cerca de 12,000 daltons.

Preparación de Ácido de -Glucurónico que contiene Oligosacáridos HA y sus extremos no reductores.

Ácido hialurónico (100 mg, Lifecore lote 1-9062-5) es tratado con HCL al 0,1 N a 80°C durante 10 horas. La solución es neutralizada con NaOH al 0,5 N y desalificada por medio de una columna Sefadex® G-20 (Farmacia) eluida con agua. El producto desalificado es congelado y secado y tratado con β -N-acetil glucosaminidasa (ec 3.2.1.30; Calbiochem) para generar fragmentos LMN-HA con cerca de 4 a 20 unidades repetidas y conteniendo ácido D-glucurónico en sus extremos no reductores. La estructura de los

oligosacáridos en confirmada por la espectroscopia NMR y el análisis de metilación.

Despolimerización del ácido hialurónico por sonicación.

Acido hialurónico (100 mg, Lifecore lote 1-9062-5) fue disuelto en 20 ml de un amortiguador de PBS de 10 mM, la suspensión fue agitada hasta disolución. La muestra fue sonicada con sonicador Branson modelo 450, (parámetros de sonicación: control de salida: 3; ciclo de trabajo: 50%; temperatura 2: 2°C) durante 18 horas. Después de diálisis liofilización, 57 mg del producto sólido fue recuperado. El peso molecular promedio del ácidohialurónico sonicado resultante fue determinado como 18,000 daltons por SEC-MALLS usando un instrumento MiniDawn (Wyatt technology, Santa Bárbara, CA) y una columna Superose® 12 HR 10/30 (Farnacia). El análisis del ¹H-NMR de las muestras a 500 MHz confirmó la estructura de la unidad repetida de disacárido del ácido hialurónico.

EJEMPLO 2

Preparación de conjugados de LMW-HA

Reducción del ácido Hialurónico tratado con Ácido con NaBH_4 .

Ácido hialurónico, despolimerizado con ácido clorhídrico (65 mg) fue disuelto en 6,5 ml de agua desionizada. El pH fue ajustado a 10 con NaOH al 0,5 N y 64,5 mg NaBH_4 agregado a la solución. La mezcla de reacción fue mantenida a temperatura ambiente durante 2 horas. El exceso de NaBH_4 fue destruido con ácido acético 1 M. La diálisis contra el agua desionizada con una membrana Diaflo® de 3,500 MWCO seguida por liofilización produjo 35 mg del producto sólido.

Oxidación periodata de ácido hialurónico reducido tratado con ácido

Las muestras de 18 mg de los polisacáridos reducidos y dimensionados fueron disueltos en 1,3 ml y 0,97 ml de una solución acuosa de 10 mM de NaIO_4 para lograr un grado de oxidación (d.o.) de 10 y 20 por ciento respectivamente. Las reacciones fueron agitadas en la oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente, y cada

una fue calmada con 20 μ L de etilen glicol. Las mezclas de reacción fueron entonces dializadas y liofilizadas para suministrar 17 mg del producto sólido.

Preparación del conjugado de ácido hialurónico tratado con ácido y toxoide de tetanus (LMW-HA/TT).

Periodate oxidada (d.o 10% y 20%) ácido hialurónico tratado con ácido (10 mg de cada uno respectivamente) y monómero de toxoide de tetanus purificado (5 mg de cada muestra, Statens Serum Institute Copenhagen, Denmark) fueron disueltos en 0,5 ml de fosfato de sodio al 0,2 M, pH 7,4. Cianoborohidruro de sodio recristalizado (10 mg para cada muestra) se agregó y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante la noche. El progreso de la reacción fue monitoreada a diversos tiempos usando el sistema Bio-Rad (Biológico) con una columna Superose® 12 hr 10/30 (Farmacia). La conjugación del polisacárido en proteína fue indicada por un incremento progresivo de un pico de UV (280 nm) eluyendo en el volumen vacío de la columna. Después de que la conjugación fue completada, 10 mg de NaBH_4 en 1 ml de NaOH al 0,1 N fue agregado a cada muestra para poder reducir cualquier aldehído no conjugado remanente. El conjugado fue purificado por

medio de pasarlo sobre una columna (1,6 x 60 cm) de Superdex® de FG (Farmacia) eluyendo con PBS 10 mM que contienen 0,01 por ciento de timerosal. Fracciones correspondientes al pico del volumen vacío fueron registradas y almacenadas a 4°C. Se les designo como conjugados 1 y 2 para 10 y 20 por ciento de oxidación en sus polisacáridos, respectivamente.

Oxidación de Periodatos de Ácido Hialurónico Sonicado

Dos muestras de 26 mg y 30 mg de polisacárido sonificado fueron cada una disueltas en 2 y 1,5 ml de agua desionizada, respectivamente y tratados con 0,65 ml y 1,5 ml de NaIO₄ acuoso 10 mM para lograr grados de oxidación (d.o.) de 10 y 20 por ciento, respectivamente. Las reacciones fueron agitadas en la oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente, y cada reacción fue calmada con 20 µL de etilen glicol. Las soluciones fueron entonces dializadas y liofilizadas para suministrar 24 y 25 mg de producto respectivamente.

Preparación del Conjugado de Ácido Hialurónico Sonicado-Toxoide de Tetanus (LMW-HA/TT).

El HA oxidado sonificado y periodatado (7 mg de cada muestra, d.o. 10% y 20%) Y monómero de toxoide de tetanus purificado (3,5 mg para cada muestra) fueron disueltos entre 150 μ L de fosfato de sodio al 0,2 M con un pH de 7,4. Cianoborohidruro de sodio (7 mg para cada muestra) fue agregado, y las mezclas se mantuvieron a temperatura ambiente durante la noche. El progreso de cada reacción de conjugación fue monitoreado por la remoción de alícuotas desde la mezcla de reacción a diferentes tiempos y con análisis subsecuente sobre un sistema Bio-Rad (Biologic) equipado con una columna Superose® 12 HR 10/30 (Farmacia). La conjugación del polisacárido en polipeptido fue indicada por el incremento progresivo de un pico de absorción de UV (280 nm) eluyendo en el volumen vacío de la columna. Después de que la conjugación fue completada, NaBH₄ (10 mg en 1 ml de NaOH al 0,1 N para cada muestra) se agregó a las mezclas de reacción para reducir cualesquier aldehído no conjugado remanente. Los conjugados fueron purificados por pasajes sobre una columna Superdex® 200 PG (Farmacia), eluida con 10 mM de PBS que contenía 0,01 por ciento de timerosal. Las fracciones correspondientes al pico del volumen vacío fueron guardadas y almacenadas a 4°C y fueron designadas

como conjugados 3 y 4 para 10 y 20 por ciento de oxidación en sus polisacáridos, respectivamente.

Acoplamiento del ácido hialurónico sonicado al Porin Neisserial recombinante clase 3 (LMW-HA/rPorB)

Ácido hialurónico oxidado sonicado y periodatado (20 mg, 20% de o.d.) y rPorB (10 mg) fueron disueltos en 717 µL de un amortiguador de 0,25 M de HEPES, pH 8,5, que contenía NaCl al 0,25 M y 0,05% de Zwittergent 2 3,14 (Calbiochem, San Diego, CA.) Cianoborohidruro de sodio (20 mg) se agregó, y la mezcla fue incubada a 37°C durante 1 día. Después de que la conjugación fue completada, 10 mg de borohidruro de sodio en 1 ml de NaOH al 0,1 N fue agregado a la mezcla de reacción para remover cualesquier aldehído remanente. El conjugado fue purificado por pasaje sobre una columna Superdex® 200 PG (Farmacia), eluido con 10 mM de PBS que contenía 0,01% de timerosal. Las fracciones correspondientes al pico del volumen vacío, según se monitoreo por la absorbancia de UV a 280 nm, fueron almacenados a 4°C y etiquetados como conjugados 5.

Preparación de Conjugados de Ácido Hialurónico -Albúmina de suero Humano. (LMW-HA/HAS) como antígenos de recubrimiento ELISA

Ambos ácidos hialurónicos tratados con ácido y oxidados sonicados y periodatados con un d.o. de 10 por ciento, y albúmina de suero humano (HSA, Fluka) fueron disueltos en 0,5 ml de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7,4. Cianoborohidruro de sodio fue agregado, y las mezclas fueron incubadas a 37°C durante 1 día. Después de que la conjugación fue completada, borohidruro de sodio en NaOH al 0,1 N fue agregado a la mezcla de reacción como se describió para otros conjugados para remover cualquier aldehído remanente. Los conjugados fueron dializados y liofilizados.

Tabla 1: Características fisicoquímicas de los conjugados de LMW-HA/Proteína:

Conjugados	Portador	Modo de Fragmento	PS d.o.	Conjugado en % de HA
1	TT	Sonicación	10	30
2	TT	Sonicación	20	28
3	TT	Hidrólisis con ácido	10	31
4	TT	Hidrólisis con ácido	20	20
5		Sonicación	20	16

Los contenidos de ácido hialurónico y proteína en los conjugados fueron medidos por el carbazol (para ácidos urónicos) (Bitter, T. 1962 Anal. Biochem. 4: 330) y ensayos comasie (Bio-Rad) respectivamente.

EJEMPLO 3

Aislamiento de los inhibidores de oligosacárido de ácido hialurónico

Liase y hialuronato (EC 4:2.2.1) de streptomyces hialurolyticus (Sigma Biochemicals), el contenido de 3 ampollas en 10 mM de PBS fue agregado al ácido hialurónico sonificado (60 mg) e incubado a 37°C durante 1,5 horas. La reacción se detuvo por la ebullición de la mezcla de reacción a 100°C durante 1 minuto en un baño de agua. El progreso de la digestión enzimática fue monitoreada por la remoción de alícuotas de la mezcla de reacción y el análisis en un sistema Bio-Rad (Biologic) equipado con una columna Superdex® de péptido (Farmacia), con 10 mM de PBS como eluyente a una velocidad de flujo de 0,75 ml /min. La solución fue almacenada a 4°C hasta su purificación posterior.

El aislamiento de los oligosacáridos fue llevado a cabo por cromatografía de intercambio de anión con una columna mono-Q HR 5/5 (Farmacia) usando un HPLC 1090 (Hewlett Packard 1090 serie II) equipado con un detector por arreglo de diodos, un autoinyector programable, un recolector de fracción, y el programa de software Hewlett Packard Chemstation para el control del sistema y la adquisición de datos/procesamiento. Un gradiente de etapa de cloruro de sodio en un amortiguador Tris-HCl fue usado para la separación. Dos fracciones de oligosacárido correspondientes a un dimer (DP2) y un tetramero (DP4) eluyendo, respectivamente entre 18 a 26 minutos y entre 28 a 31 minutos fueron recolectados, liofilizados y desalificados usando una columna Sefadex G-10 (Farmacia) y agua desionizada como eluyente. La estructura de los oligosacáridos fue confirmada por examen de su espectro $^1\text{H-NMR}$ a 500 MHz. El oligosacárido DP2 correspondió a $\Delta 4,5\text{-}\beta\text{-GlcU-(1,3)-D-GlcNAc}$, y el DP4 a $\Delta 4,5\text{-}\beta\text{-GlcU-(1,3)-}\beta\text{-D-GlcNAc-(1,4)-}\beta\text{-D-GlcU-(1,3)-}\beta\text{-D-GlcNAc}$.

EJEMPLO 4

Estudios Serológicos: Inmunoespecificidad de antisuero de conejo en Ácidos Hialurónicos de bajo peso Molecular

(LMW-HAS)

Estudios de inmunogenicidad

Conejos blancos New Zealand fueron inmunizados subcutáneamente, 3 veces a intervalos de 21 días (días 0, 21, y 41) con 10 µg de polisacárido conjugado por dosis de LMW-HA/TT en un adyuvante completo Freund's para la primera dosis y un adyuvante incompleto Freund's para la segunda y tercer dosis. Los conejos fueron drenados por el oído a los días 21, 31 y 41 y un ensayo de punción cardíaca fue llevado a cabo 10 días después de la tercera inmunización.

Titulación del antisuero de Conejo en placas recubiertas con LMW-HA/HSA

Placas microtitulo (NUNC polisorp) fueron recubiertas pasivamente con un LMW-HA/HSA sonificado o con LMW-HA hidrolizado por ácido/HSA como conjugados (aproximadamente 25 ng PS en 100 µL/pozo) diluidos en PBS (50 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH = 7,4) durante 1 hora a 37°C. Después de lavar las placas con PBS más 0,05% de Tween® (PBS Tween, pH = 7,4) las placas fueron recubiertas posteriormente con 150 µL/pozo de PBS

más 0,1% de albúmina de suero Bovino (PBS + BSA, pH 7,4) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del recubrimiento posterior las placas fueron nuevamente lavadas y almacenadas de entre 2 a 8°C hasta que fueron usadas.

El antisuero de conejo fue diluido seriadamente en PBS Tween en pozos de placas microtitulios recubiertas con sea LMW-HA sonificado/HSA o con LMW-HA hidrolizado con ácido/HSA hasta un volumen final de 100 µL/pozo e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas con PBS Tween y 100 µL de un conjugado de un IgG de cabra anticonejo-peroxidasa de rábano (Kirkegaard and Perry Laboratories) diluido 1:2,500 en PBS Tween fue agregado a cada pozo. Luego de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, las placas fueron nuevamente lavadas y 100 µL de una solución en sustrato de TMB (KPL) fue agregada a cada pozo. Las placas fueron incubadas durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente y el desarrollo de color fue detenido por la adición de 100 µL de una solución de un componente de paro (KPL) en cada pozo. La densidad óptica de cada pozo fue leída en 450 nm, y curvas de titulación fueron generadas para cada condición.

Inhibición del Ligado de Antisuero de Conejo con LMW-HA sonificado/TT sobre placas recubiertas con LMW-HA/HSA.

Las placas microtitulo fueron recubiertas como se mencionó anteriormente. El antisuero de conejo con LMW-HA/TT antisonificado fue titulado sobre placas recubiertas con conjugado de LMW-HA sonificado/HSA. La dilución correspondiente a aproximadamente la mitad de la señal máxima fue escogida como apropiada para los estudios de inhibición. El antisuero de conejo fue diluido en PBS Tween. Los inhibidores fueron diluidos seriadamente en amortiguador que contenía la disolución de antisuero en Titerbutes® (Bio-Rad) y 100 µL de cada muestra fue tomada del Titerbutes® y agregada directamente a los pozos de las placas microtitulos recubiertas. Las muestras fueron incubadas en las placas microtitulo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas microtitulo fueron lavadas con PBS Tween y luego 100 µL de un conjugado de IgG de cabra anticonejo-HRP (KPL; diluido 1:2,500 en PBS Tween fueron agregados a cada pozo. Las placas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, lavadas con PBS Tween. 100 µL de una solución de sustrato de TMS (KPL) fue agregada a cada pozo. Las placas fueron

incubadas a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos y el desarrollo de color fue detenido con la adición de 100 μ L a cada pozo de una solución de un componente de tensión (KPL), y la absorbancia de 450 nm fue leída. La inhibición fue determinada como porcentaje de la señal máxima lograda con antisuero diluido en la ausencia de cualquier inhibidor.

Respuesta Inmune de los Conejos Blancos New Zealand

Ocho conejos blancos New Zealand fueron inmunizados con tres inyecciones subcutáneas de cada uno de el ácido hialurónico sonicado-toxoide de tetanus (LMW-HA/TT) o ácido hialurónico hidrolizado en ácido-toxoide de tetanus (LMW-HA/TT) (cuatro animales para cada conjugado). La figura 4 muestra la respuesta inmune para cada conejo individual para el inmunógeno del conjugado de LMW sonicado-HA/TT. Todos los cuatro animales respondieron al ácido hialurónico con títulos ELISA en exceso de 50,000. La figura 5 muestra la respuesta inmune para los conejos individuales inmunizados con el conjugado de LMW-HA hidrolizado con ácido-TT. Todos los cuatro animales individuales respondieron al ácido hialurónico con títulos ELISA de aproximadamente 10,000 o mayores.

La respuesta inmune de los conejos se demostró que era específica dependiendo de la naturaleza del conjugado usado para las inmunizaciones. La figura 6 muestra que los anticuerpos de animales que fueron inmunizados con el conjugado de LMW-HA sonificado/TT reaccionó más fácilmente a las placas recubiertas con LMW-HA sonificado/HSA, en vez de con el LMW-HA hidrolizado con ácido/HSA. Existe por lo menos un orden de diferencia de magnitud en la inmunoreactividad entre estos diferentes antígenos recubiertos. Lo inverso se mantiene verdad para los animales inmunizados con el conjugado LMW-HA hidrolizado con ácido/TT. La figura 7 muestra un orden de preferencia de magnitud para estos antisueros al LMW-HA hidrolizado con ácido/HSA en oposición al LMW-HA sonificado/HSA en fase sólida.

La especificidad del antisuero generado por LMW-HA sonificado/TT en conejos blancos New Zealand.

La especificidad del antisuero producido en conejos por inmunización con el LMW-HA sonificado/TT fue examinado por estudios de inhibición en placa microtitulo. Los resultados de los estudios de inhibición usando antisuero

de los conejos # 75295 inmunizados con LMW-HA sonificado/TT son representados en las figuras 8 y 9. La figura 8 indica varias especies de HA sonificado lo mismo que diversas especies de HA hidrolizado con ácido usado usados como inhibidores. En este experimento, todas las formas de HA hidrolizado por ácido fueron inhibidores pobres del anticuerpo ligado al LMW-HA sonificado recubierto/HSA. Con respecto a las especies sonicadas de los inhibidores, la tendencia parece que entre más pequeño el fragmento de HA producido por sonicación, más eficiente es el fragmento es como inhibidor. Esto indica que en las moléculas más pequeñas HA presentan más epítopes por unidad de masa de las especies más grandes.

Los resultados presentados en la figura 9 elucidan adicionalmente este hallazgo. De aquí en adelante, el HA nativo de muy alto peso molecular es visto como un inhibidor muy pobre, aunque casi tres órdenes de magnitud menos que el HA de 20 kD usado como inmunogen. Especies más pequeñas fueron también usadas como inhibidores en este experimento. La forma tetrasacárido de HA fue un inhibidor relativamente eficiente, mientras que las formas disacárido y ácido D-glucurónico no exhibieron el ligado del anticuerpo a la fase sólida en ningún momento.

Los resultados de los estudios de inhibición llevados a cabo usando antisuero de conejo # 72700, que también fue inmunizado con el conjugado IMW-HA sonificado/TT, se presentan en las figuras 10 y 11. Estos resultados son bastante similares a aquellos obtenidos para el conejo #75295 como se describió previamente. La figura 10 muestra resultados similares a aquellos vistos en la figura 9. Esto es, la forma tetrasacárido del HA y la forma de inmunígeno sonificado (20K) del HA en los pozos de inhibición, mientras que el disacárido inhibió el pozo, mientras que el disacárido y las formas nativas de HA inhibieron pobremente. La relación entre el tamaño del HA y la inmunoreactividad fue examinada adicionalmente usando una forma hexasacárido de HA. Estos resultados se dan en la figura 11. Los resultados indican que esta forma de HA es capaz de inhibir completamente el ligado del anticuerpo. A partir de estos estudios es aparente que por lo menos la forma tetrasacárido (dos subunidades repetidas) de HA es necesario para la inhibición completa. La forma disacárida de HA es insuficiente para la inhibición y que la forma nativa de la molécula no es un inhibidor óptimo. Por lo tanto, una reducción en el

95

tamaño de la molécula de HA nativa grande es preferible para el reconocimiento inmune.

EJEMPLO 5

Estudios de inmunogenicidad en Ratones

Antisero Producido en Ratones con Conjugados de Ácido Hialurónico-Proteína.

Tanto ratones BALB/c y CD1 fueron inmunizados con tres inyecciones de vacunas de conjugado LMN-HA/Proteína. Los conjugados fueron LMN-HA sonicado/TT, como en los conejos, o un conjugado de HA sonicado en rPorB (LMN-HA/rPorB). La vacuna del conjugado LMN-HA/TT no produjo una respuesta inmune mayor que aquella del control negativo. Sin embargo, el conjugado LMN-HA/rPorB produjo títulos ELISA medibles en 100% de los animales inmunizados. Estos datos son mostrados en las figuras 12 y 13 para los ratones BALB/c y ratones CD1 respectivamente.

EJEMPLO 6

Experimentos De Protección

Immunización pasiva

Antisuero de ratón en conjugados de LYM-HA/TT fueron usados para los ensayos de protección en inmunización pasiva en ratones Balb/c adultos. El antisuero de conejo (0,5 ml) diluido en la mitad de PBS estéril fue inyectado intraperitonealmente (IP) dos horas antes del reto (IP) con una dosis de reto en LD90 de un estreptococcus grupo A (GAS) tipo 6 o tipo 3. El antisuero de un conejo inmunizado con salina de amortiguador de fosfato (PBS) y adyuvante completo Freund's (CFA) lo mismo que un antisuero de conejo conseguido contra el carbohidrato estreptococal de grupo A conjugado con el toxoide de tetanus fueron incluidos en el experimento de protección como suero de control. La supervivencia fue revisada durante 10 días después del reto.

Los LD90 fueron determinados previamente después de la inmunización de los ratones Balb/c con antisuero de conejo inmunizado con PBS/CFA seguido por 2 horas después por un reto IP en un rango de dosis de GAS tipo 6 o tipo

3. El LD90 para el GAS tipo 6 y tipo 3 se determinó como 5×10^3 y 2×10^4 cfu/mL respectivamente. Los resultados de los experimentos de los experimentos del reto se muestran en las figuras 14 y 15.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de conjugado inmunogénico que comprende ácido hialurónico ligado covalentemente a un portador de polipéptido inmunológicamente aceptable.
2. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde mayor acerca de 50% de las moléculas de ácido hialurónico poseen un terminal no reductor de ácido glucurónico y/o un residuo de ácido glucurónico no saturado.
3. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el ácido hialurónico es un ácido hialurónico de bajo peso molecular con un peso molecular de alrededor de 400 Kd o menos y un peso molecular de alrededor de 600 daltons o más.
4. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde por lo menos 90% o más de los fragmentos de ácido hialurónico de bajo peso molecular poseen un terminal no reductor de ácido

glucurónico y/o residuos de ácido glucurónico no saturado.

5. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde por lo menos 95% o más de los fragmentos de ácido hialurónico de bajo peso molecular poseen un terminal no reductor de ácido glucurónico y/o residuo de ácido glucurónico no saturado.

6. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde por lo menos 98% o más de los fragmentos de ácido hialurónico de bajo peso molecular poseen un terminal no reductor de ácido glucurónico y/o residuo de ácido glucurónico no saturado.

7. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde por lo menos 99% o más de los fragmentos de ácido hialurónico de bajo peso molecular poseen un terminal no reductor de ácido glucurónico y/o residuo de ácido glucurónico no saturado.

8. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el ácido hialurónico de bajo peso molecular es de alrededor de por lo menos cerca de 4 residuos de glicocil en tamaño.
9. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el ácido hialurónico de bajo peso molecular posee cerca de 2 acerca de 20 subunidades de disacárido.
10. El conjugado inmunogénico de acuerdo a la reivindicación 9, en donde el ácido hialurónico de bajo peso molecular tiene o es de cerca de 2 acerca de 10 sub unidades de disacárido.
11. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el portador de polipéptido se selecciona del grupo que consiste de toxoide de tetanus, toxoide de difteria, toxoide de pertussis, un polipéptido inmunogénico derivado de estreptococos un polipéptido inmunogénico derivado de influenza, un polipéptido inmunogénico derivado de meningococo, un polipéptido inmunogénico derivado

de un neumococo, y un polipéptido inmunogénico derivado de E.coli.

12. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el portador de polipéptido es una porina de neisseria.

13. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el conjugado es ligado directamente.

14. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el conjugado elicit anticuerpos que se ligan a un epítopo que comprende ácido glucurónico o un ácido glucurónico no saturado como el terminal no reductor de azúcar en un ácido hialurónico de bajo peso molecular.

15. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el conjugado elicit anticuerpos que ligan el ácido hialurónico capsular presente en la bacteria.

16. El conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la bacteria es un estreptococo grupo A o un estreptococo grupo C.
17. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con la reivindicación 3, y un portador farmacéuticamente aceptable.
18. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende adicionalmente un adyuvante fisiológicamente aceptable.
19. Un método para preparar un conjugado de ácido hialurónico de bajo peso molecular-polipéptido de molécula que comprende covalentemente el ligado de fragmentos de ácido hialurónico de bajo peso molecular a un polipéptido inmunológicamente adecuado, en donde 50% o más de los fragmentos de ácido hialurónico de bajo peso molecular tienen un ácido glucurónico y/o un residuo de ácido glucurónico no saturado en el terminal no reductor.
20. El método de la reivindicación 19, en donde el método comprende ligar covalentemente un ácido

hialurónico de bajo peso molecular a un polipéptido inmunológicamente adecuado que comprende aminación reductiva.

21. Un anticuerpo purificado que liga a la molécula de conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3.

22. El anticuerpo purificado de acuerdo con la reivindicación 21, en donde los fragmentos de ácido hialurónico de bajo peso molecular son por lo menos de 4 residuos de glicocil en tamaño.

23. El anticuerpo purificado de acuerdo con la reivindicación 22, en donde los fragmentos de ácido hialurónico son de por lo menos cerca de 4 residuos de glicocil y no más de cerca de 4 kD en tamaño.

24. Una composición farmacéutica efectiva para el tratamiento o la inhibición de infecciones estreptococales grupo A o estreptococales grupo C comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo lícitado, por la composición de acuerdo con la reivindicación 17, un

anticuerpo de acuerdo con la 21, o un anticuerpo elicito para un ácido hialurónico de bajo peso molecular conjugado con una liposoma.

25. Un método para elicitar una respuesta de anticuerpo en un mamífero, dicho método comprende la etapa de administrar al mamífero individual una cantidad de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17 en una cantidad que es suficiente para elicitar una respuesta de anticuerpo.

26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el mamífero es un humano.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la composición farmacéutica es administrada intramuscularmente, subcutáneamente, intraperitonealmente o intravenosamente.

28. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la composición farmacéutica es administrada en una cantidad de alrededor de 0,1 acerca de 50 microgramos por kilogramo de peso de cuerpo.

29. Una vacuna que elícita niveles efectivos de anticuerpos de ácido hialurónico de anti bajo peso molecular en humanos que comprende el conjugado inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 3.

30. Un método para inhibir la infección estreptococal en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 en una cantidad suficiente para inhibir la infección.

31. Un método para inhibir la progresión de infección en un mamífero por bacterias que contienen HA, comprende administrar al mamífero una composición que comprende la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 24 en una cantidad suficiente para inhibir la progresión de la infección.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en donde las bacterias son estreptococos de grupo A o estreptococos de grupo C.

33. Un Kit de inmunoensayo para diagnóstico para detectar la infección por estreptococo que comprende un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 21.

FIG. 1

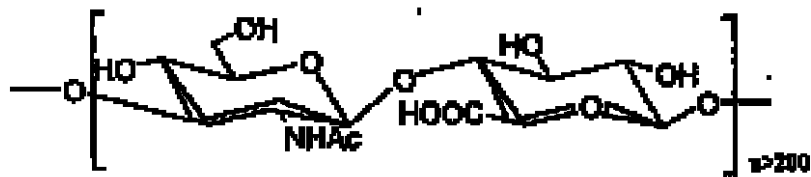


FIG. 2

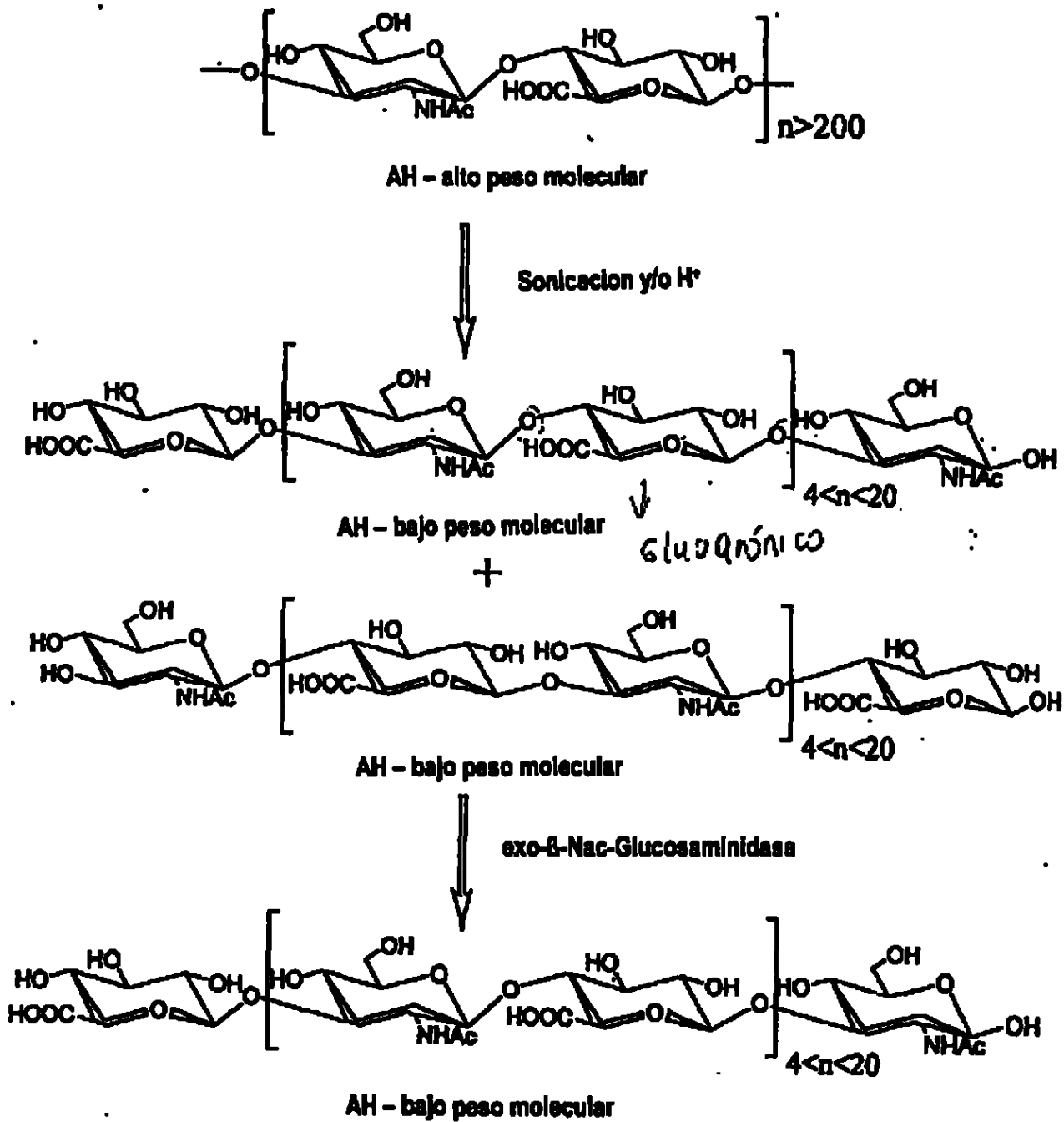
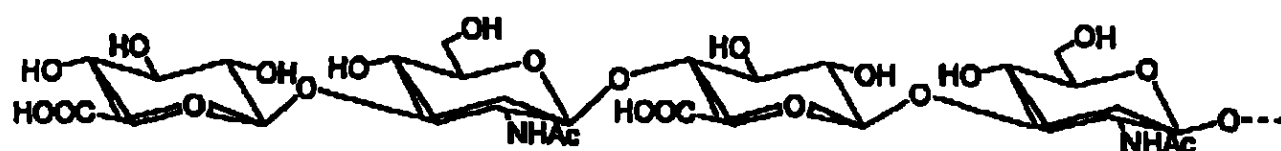
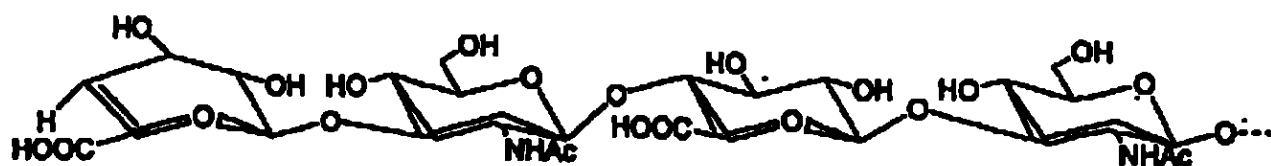


FIG. 3

a) saturado.



b) insaturado



**Títulos Elisa de Ratones Blancos de Nueva Zelanda
Inmunizados con conjugados HA-TT sonificados**

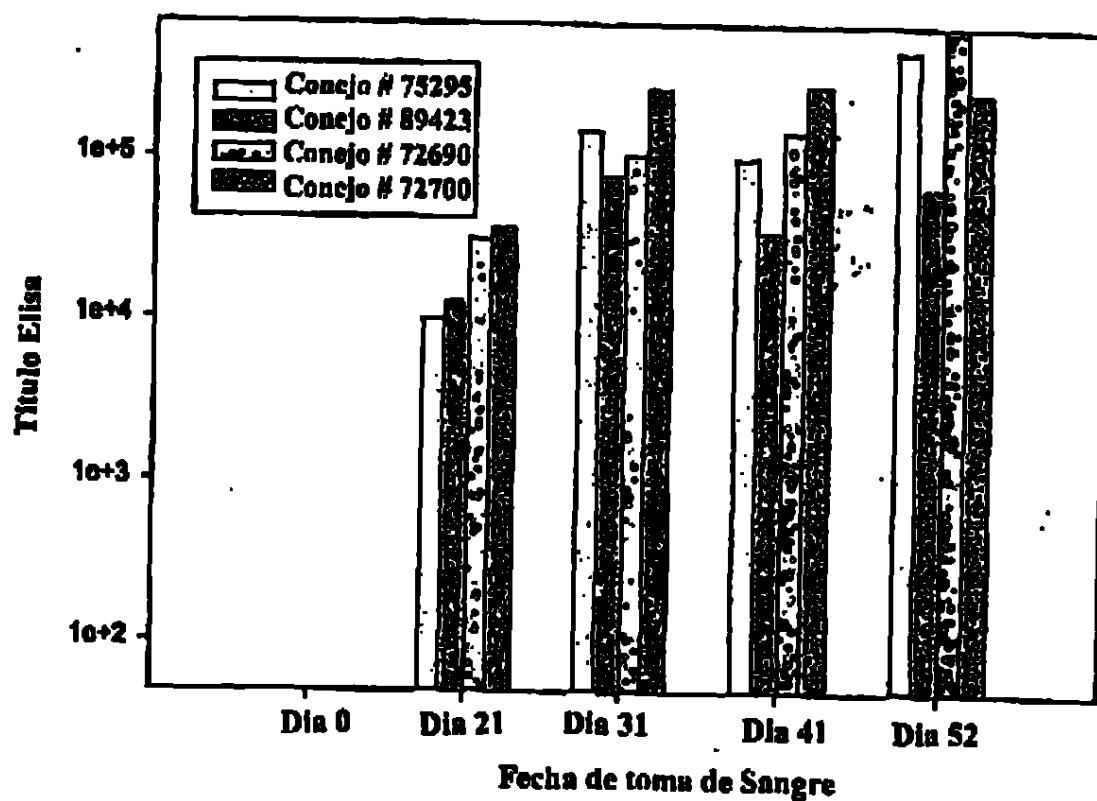


Figura 4

Titulos Elisa de Ratones Blancos de Nueva Zelandia
Inmunizados con conjugados HA-TT sonificados

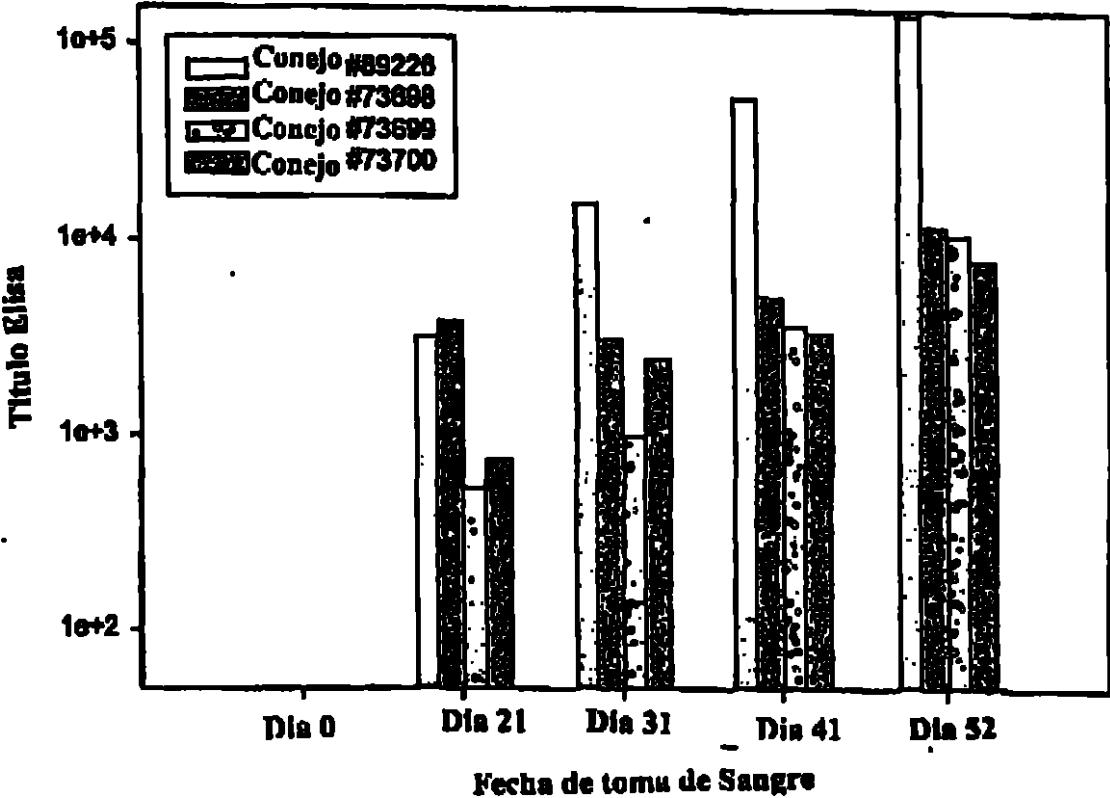


FIG. 5

12

Titulación de antisueros de Conejos blancos de Nueva Zelanda
Conejos Inmunizados con conjugado AH-TT sonificado

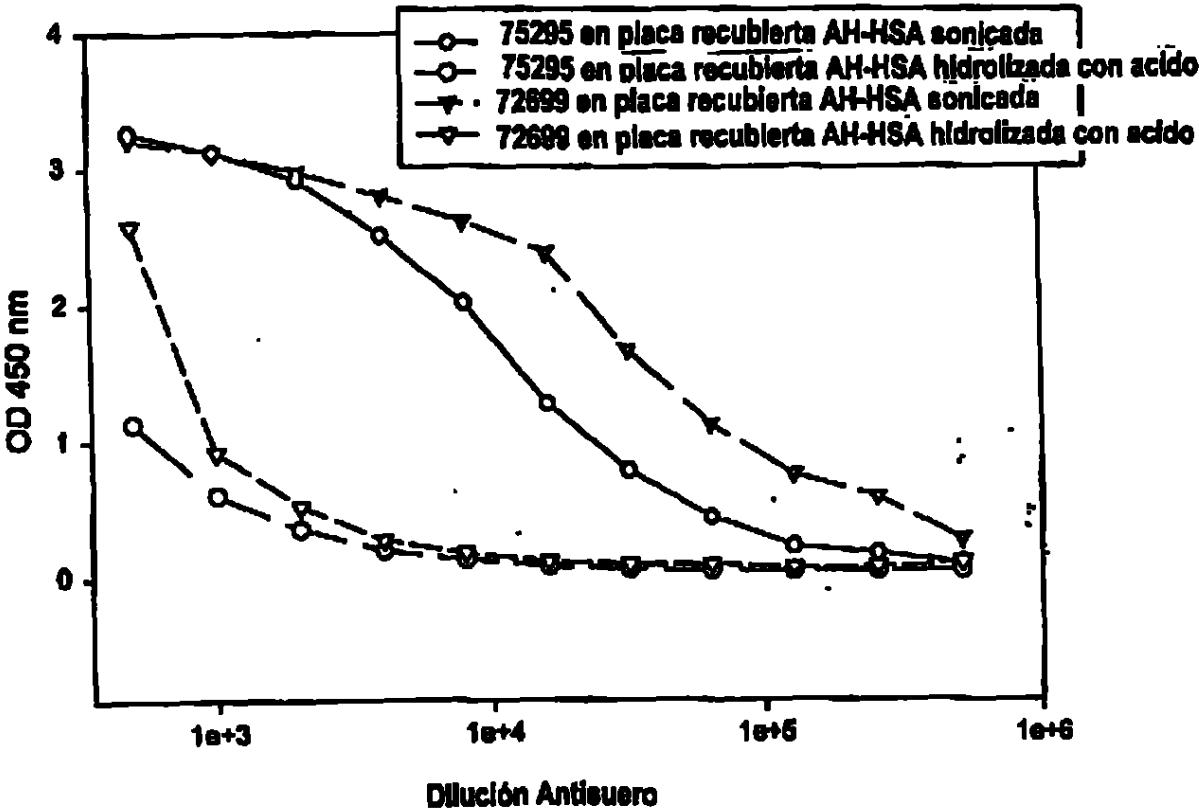


FIG. 6

113

Titulacion de antisueros de Conejos blancos de nueva Zelandia
Conejos, inmunizados con conjugados AH-TT hidrolizado con acido

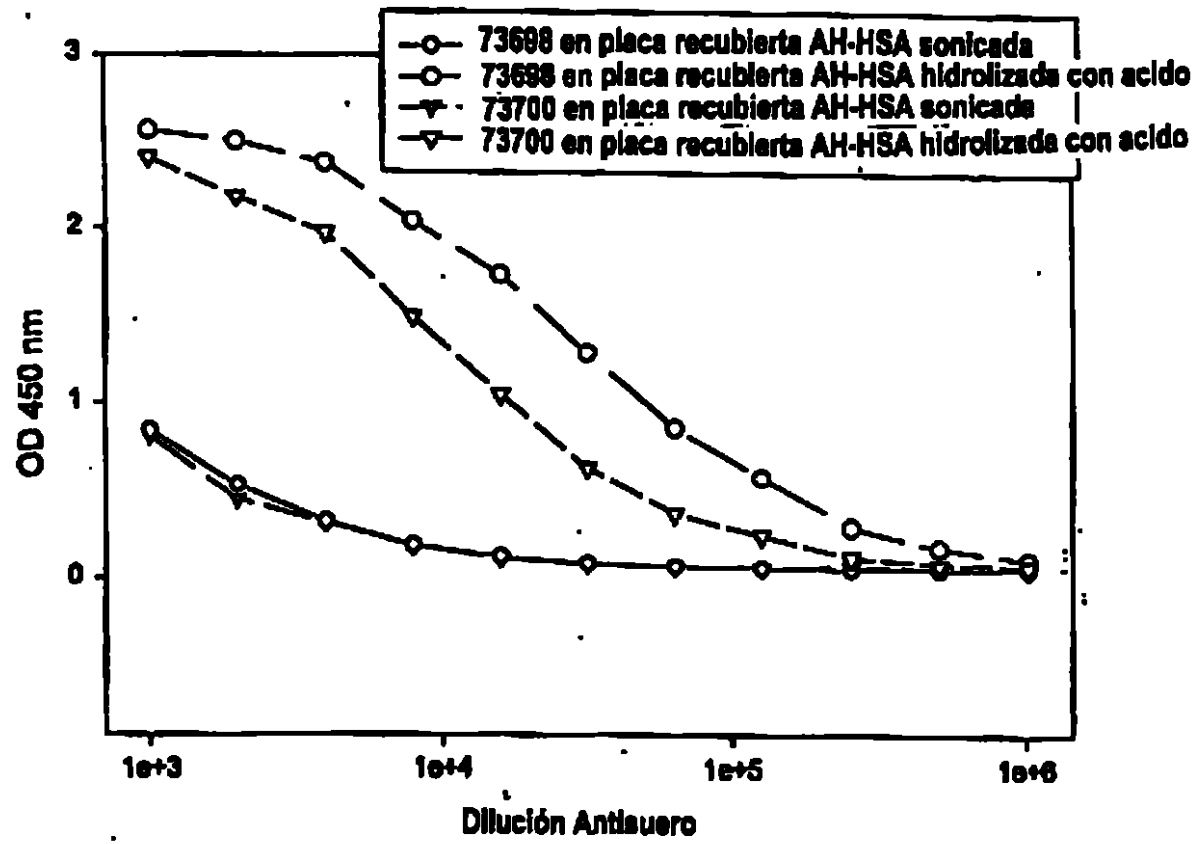


FIG. 7

24

Inhibición de conejo Anti-sonicado AH-TT # 75295
Placas recubiertas AH-HSA Sonicadas

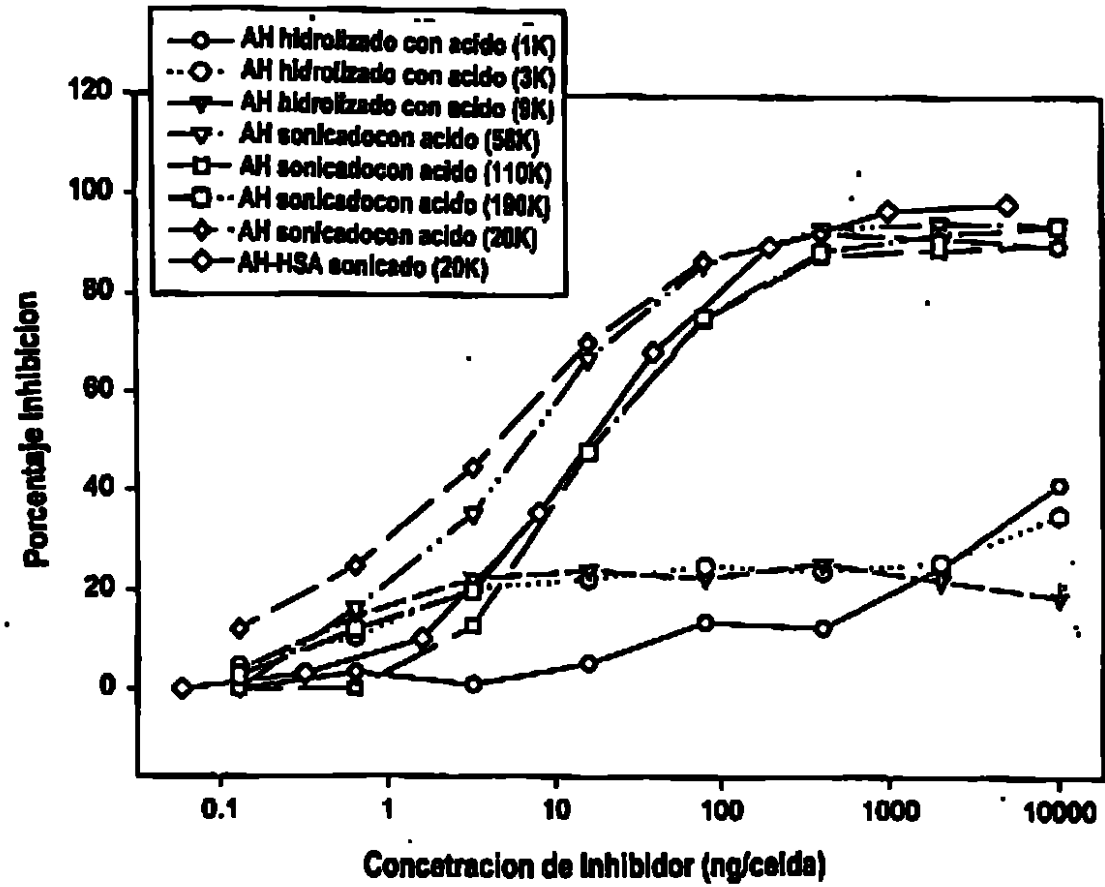


FIG. 8

Inhibición de conejo Anti-sonicado AH-TT # 75285
Placas recubiertas AH-HSA Sonicadas

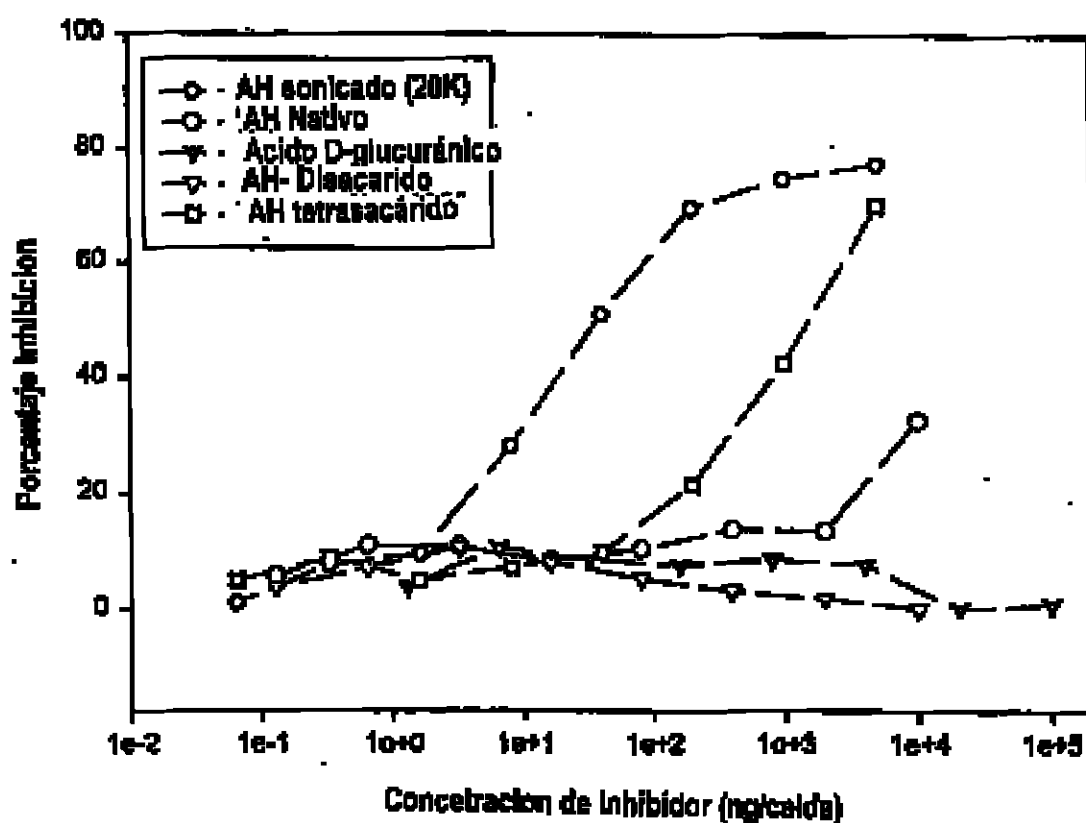


FIG. 9

116

Inhibición de conejo Anti-sonicado AH-TT # 72700
Placas recubiertas AH-HSA Sonicadas

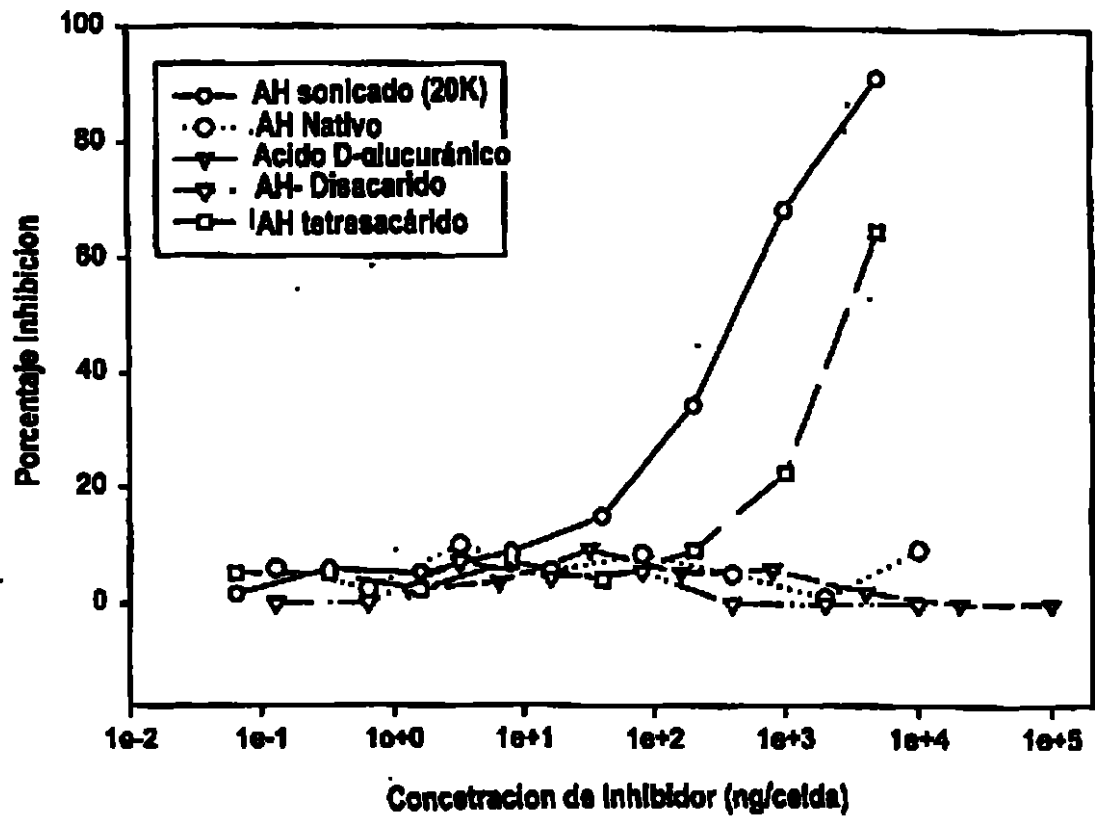


FIG. 10

117

Inhibición de conejo Anti-sonicado AH-TT # 72700
Placas recubiertas AH-HSA Sonicadas

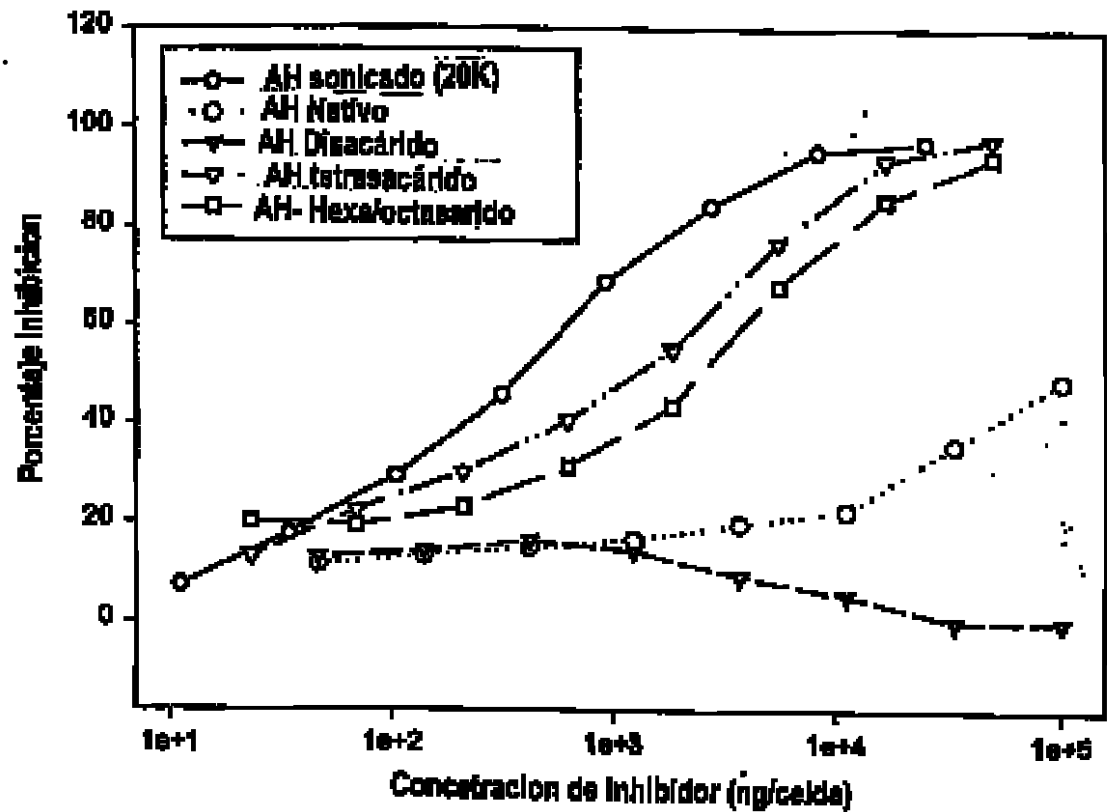


FIG. 11

18

Titulos ELISA de Ratones BALB/c
Inmunizados con conjugados AH- rPorB

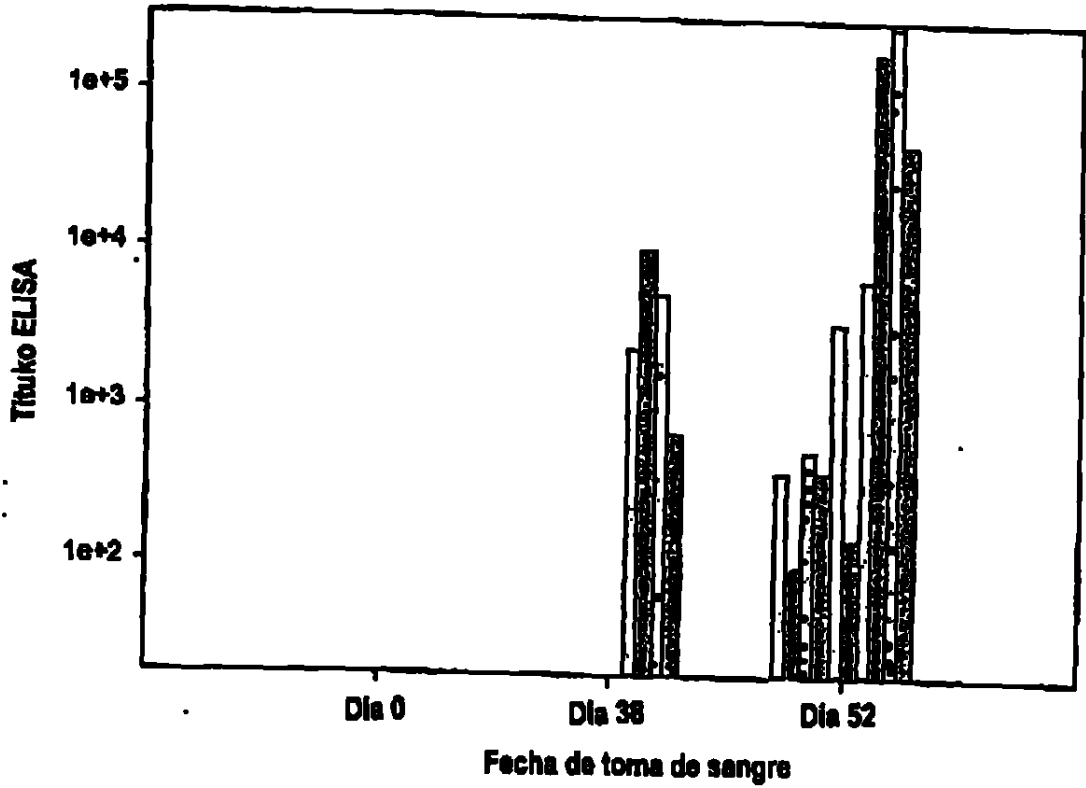


FIG. 12

119

**Titulos ELISA de ratones CD1
Inmunizados con conjugados AH-rPorB**

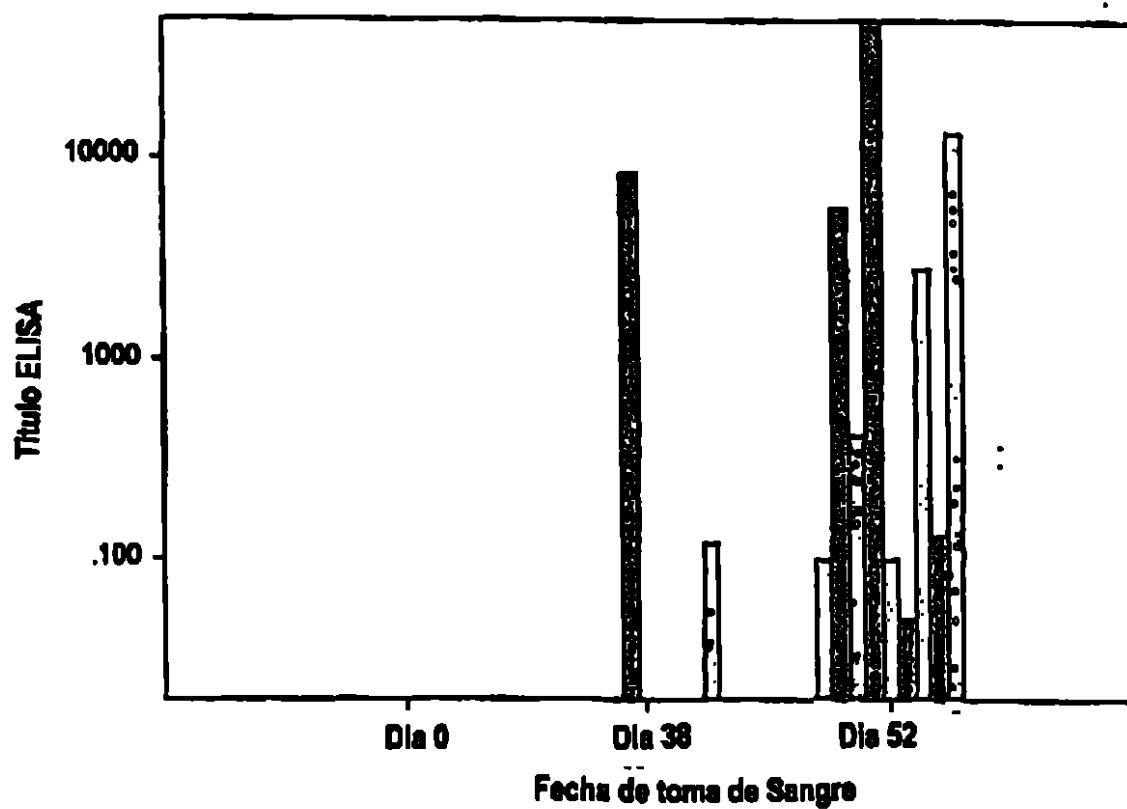


FIG. 13

Imunización Pasiva de BALB/c con anticuerpos de conejo
Prueba con Gas tipo 6

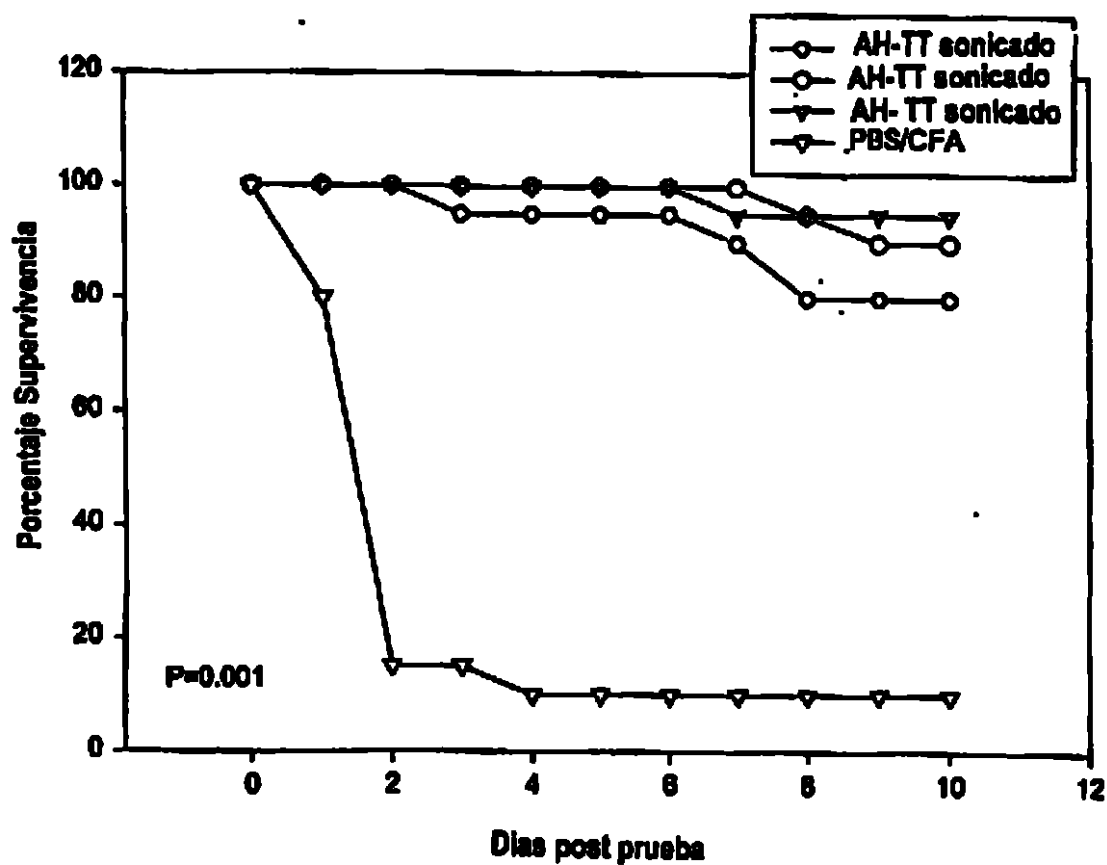


FIG. 14

121

Immunización Pasiva de BALB/c con anticuerpos de conejo
Prueba con Gas tipo 3 D58

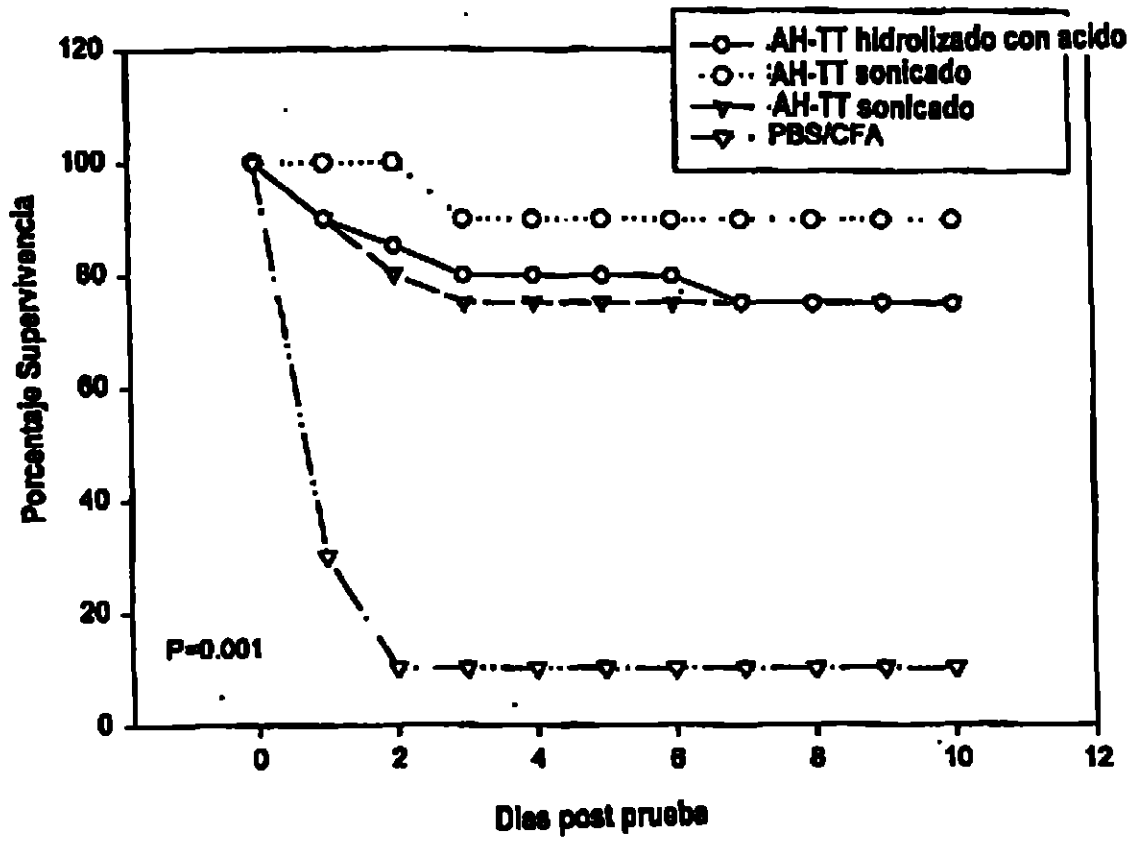


FIG. 15

122

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference BAXE/P26487PC	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/ISPEA418)	
International application No. PCT/EP02/05310	International filing date (day/month/year) 10/06/2002	Priority date (day/month/year) 11/05/2001
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K47/48		
Applicant BAXTER INTERNATIONAL INC.		
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 10 sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of sheets.		
3. This report contains indications relating to the following items: - I ☒ Basis of the report - II ☐ Priority - III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability - IV ☐ Lack of unity of invention - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement - VI ☐ Certain documents cited - VII ☐ Certain defects in the international application - VIII ☐ Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 26/11/2002	Date of completion of this report 10 07 2003	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.O. 5516 Patentkan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel: +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 apo nl Fac: +31 70 340 - 3016		Authorized officer Gonzalez Ramon, N Telephone No. +31 70 340 2458 

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. **PCT/EP02/05310**

I. Basis of the report

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

Description, pages:

1-28 as originally filed

Claims, No.:

1-33 as originally filed

Drawings, sheets:

1/15-15/15 as originally filed

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

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

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

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

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

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

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

124

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/EP02/05310**

☐ the drawings, sheets:

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

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

6. Additional observations, if necessary:

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

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

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 1-11, 13-32 partially, 33.

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 25-28, 30-32 in relation to industrial applicability relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):
see separate sheet

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

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

☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 1-11, 13-32 partially, 33.

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

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

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

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

1. Statement

125

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/EP02/05310**

Novelty (N)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-3, 8, 13-29, 31
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-32
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	see separate sheet
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP02/05310

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

Claims 25-28, 30-32 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

In the present application, the International Searching Authority has restricted the search under the following objections under Articles 8 and 6 PCT:

Present claims 1-11, 13-33 relate to an extremely large number of possible compounds defined as "immunologically-suitable polypeptide" (claims 1, 19, 20) "polypeptide conjugate" (claim 19), "immunogenic polypeptide derived from..." (claim 11). Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. In the present case, the claims lack support, and the application lacks disclosure. Furthermore present claims 14-16, 25-32 relate to compounds/methods defined by reference to desirable characteristics or properties, namely: "the conjugate/vaccine elicits antibodies that bind a..." (claims 14, 15, 28); "in an amount which is sufficient to elicit an antibody response" (claim 25); "in an amount sufficient to inhibit..." (claims 30, 31). The claims cover all compounds/methods having these characteristics or properties, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds/methods.

127

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP02/05310

Claim 33 is not supported by the description (Art 8 PCT). No disclosure is contained in the present application for a diagnostic immunoassay kit as claimed.

Support is only to be found in the present application for those parts of the claims relating to the compounds prepared in the examples and those specifically mentioned in claims 11, 12 excluding the vague denominations "immunogenic polypeptide derived from...".

Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to their pharmacological profile: "immunologically-suitable polypeptide" (claims 1, 19, 20); "elicits antibodies that bind a..." (claims 14,15); "in an amount which is sufficient to elicit an antibody response" (claim 25); "in an amount sufficient to inhibit..." (claims 30, 31).

Those terms/expressions are vague and unclear and leave the reader in doubt as to the meaning of the technical feature to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear (Article 6 PCT).

The International Preliminary Examination Authority fully agrees with these objections, therefore no international Preliminary Examination will be carried out in respect of subject-matter which is not covered by the search report (Rule 66.1(e) PCT)

Re Item V

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

The applicant's attention is drawn to the fact that the present opinion expressed as to novelty, inventive step and industrial applicability refers only to subject matter for which an international search report has been drawn up (Rule 66.1(e) PCT); (i. e. those parts of the claims relating to the compounds prepared in the examples and those specifically mentioned in claims 11, 12 excluding the vague denominations "immunogenic polypeptide derived from...")

For the assessment of the present claims 17, 18, 24-29, 30-32 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP02/05310

The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

The following documents (D) are referred to in this communication:

- D1: FILLIT H M ET AL: JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 164, n . 3, 1986, pages 762-776.
- D2: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1997, no. 05, (1997-05-30) & JP 09 012600 A (SHISEIDO CO LTD), (1997-01-14).
- D3: WO 89 82646 A (FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS SRL ;PAVESIO ALESSANDRO (IT); CHIRON CO).
- D4: US-A-5 866 135 (BLAKE MILAN S ET AL).
- D5: OHAGAN D T: JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, LONDON, GB, vol. 49, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 1-10.

Novelty (Art 33(2) PCT)

The subject-matter of claims 1-3, 8, 13-29, 31 is not new in the sense of Article 33(2) PCT. The reasons therefore are the following:

D1 discloses a Hyaluronate (HA)-BSA conjugate used as antigen in an ELISA. Antibodies against said HA-BSA are also described in rabbit sera (see table 1). Furthermore the document presents evidence that the epitope of glucuronic acid is responsible for serum reactivity, and thus the antigenicity of the hyaluronic acid conjugate (see page 772, paragraph 2 discussion). The increase in antigenicity is achieved by partial enzymatic hydrolysis of hyaluronic acid rendering a low molecular weight hyaluronic acid, the same procedure as in the present application. Consequently the subject matter of claims 1-3, 8, 13-25, 27-29 is not novel in view of D1.

D2 discloses a monoclonal antibody against sodium hyaluronate obtained by immunization of mice with a protein (haemocyanin) or a phospholipid covalently conjugated to a reduced molecular weight hyaluronate (see abstract). Said low

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP02/05910

molecular weight hyaluronate, although not specified in molecular terms is to be encompassed under the broad range of molecular weight of present claim 3. Consequently the subject matter of claims 1-3, 8, 13-19, 21-29 is not new in view of D2.

D3 discloses the use of hyaluronic acid polymers for mucosal delivery of vaccine antigens including diphtheria tetanus, pertussis, meningitis (see page 13, lines 28-30). Although the compositions used for immunisation comprise the antigens in an adsorbed or entrapped form with the hyaluronic acid, and not as a covalent conjugate (see claims 1, 8-10), the antibodies elicited with the composition, as they react against the same epitopes of the present application, do inevitably fall under the scope of present claims 21, 24, 31. Consequently the subject matter of claims 21-24, 31 is not novel over D3.

Inventive step (Art 33(3) PCT)

The subject-matter of present claims 1-3, 8, 13-29, 31 as far as novel and of claims 4-7, 9-12, 30, 32 does not meet the requirements of Art. 33(3) PCT for the following reasons:

According to the description (page 2, lines 12-14) the problem underlying the present application is the prevention and treatment of gram-positive pathogens such as streptococci by means of immunisation (i.e. vaccine). As solution to the problem an immunogenic conjugate comprising hyaluronic acid covalently bound to a polypeptide carrier (tetanus toxoid, diphtheria toxoid, pertussis toxoid, streptococcal polypeptide, influenza polypeptide, meningococcal polypeptide, pneumococci or E. coli polypeptide) is proposed. Furthermore a method of preparation of said conjugates and antibodies elicited against the said immunoconjugates is also encompassed.

Document D4, which can be considered the closest state of the art for the assessment of inventive step, already addresses the problem of prevention of gram-positive pathogens, in particular group A streptococci by mean of immunisation (vaccination) with compositions containing streptococcal polysaccharides covalently linked to a bacterial protein including tetanus toxoid, cholera toxin, diphtheria toxin (see claims 3, 22-24).

The difference between D4 and the subject matter of the present application is the fact

130

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP02/05310

that hyaluronic acid is not mentioned among the streptococcal polysaccharides forming the conjugate with the polypeptide toxoids and toxins.

Consequently the problem to be solved over D4 would be the improvement of the polysaccharide conjugates used for immunisation/vaccination against gram positive pathogens.

Hyaluronic acid forms part of the streptococcal polysaccharides (as stated in description page 2, line 2 and documents referred by the applicant on page 2, lines 5-11). The skilled man, in view of the teaching of D4 in the prevention and treatment of gram-positive pathogens (in particular group A streptococcus), by immunisation with a conjugate of a streptococcal polysaccharide with a polypeptide toxoid, would have tried, with the expectation of success, the application of said teaching to the preparation of the hyaluronic acid conjugate, taking into account the teaching of D2 where covalent conjugates of the hyaluronic acid with polypeptides, elicit an immune response against the said hyaluronic acid.

In particular he would have selected low molecular weight hyaluronic acid as the most appropriate type of hyaluronic acid for producing an immune response in view of the teaching of previously discussed D1.

Obviously the intended use of an immune conjugate is immunisation or vaccination, thus inevitably the production of antibodies. Consequently antibodies elicited against the immunoconjugates as claimed in claims 21-23 cannot either be considered as involving an inventive step, moreover as bacterial polysaccharides conjugated to protein carriers, normally tetanus or diphtheria toxoids, are suggested as strategy in vaccine development (see D6, page 2, col. 2 and table 3).

Vaccines comprising the immunoconjugates (claim 29) are consequently also obvious for the skilled man in view of D5 for the same reason above.

Furthermore the method of preparing said low molecular weight hyaluronic acid-polypeptide conjugate consisting on using sodium cyanoborohydride (description page 21 of present application), as a routine technique for conjugation of polysaccharides to polypeptides, cannot either be regarded as a feature conferring inventive step to the subject matter of claims 19, 20.

✓ 131

INTERNATIONAL PRELIMINARY International application No. **PCT/EP02/05310**
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET

132

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES

PCT

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(Artículo 36 y Regla 70 PCT)

Archivo de referencia del agente o solicitante

BAXE/P26497PC

PARA ACCIÓN COMPLEMENTARIA

**Ver Notificación de Reporte de Examen Preliminar
Internacional (del PCT/IPEA/416)**

Solicitud Internacional No.

PCT/EP02/05310

Fecha de presentación internacional (día/mes/año)

10/05/2002

Fecha de Prioridad (día/mes/año)

11/05/2001

**Clasificación de Patente Internacional (IPC) o
clasificación nacional e IPC**

A61K47/48

Solicitante

BAXTER INTERNATIONAL INC.

1. Este Reporte de Examen Preliminar Internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se remite al solicitante de acuerdo con el Artículo 36.
 2. Este REPORTE consista de un total de 10 hojas, incluyendo esta hoja de portada.

☐ Este reporte también se acompaña por ANEXOS, es decir hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido corregidos y son la base para este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones hechas antes a esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de acuerdo con el PCT).
- Estos anexos consisten de un total de hojas.
3. Este Reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

134

- I ☒ Base del Reporte
- II ☐ Prioridad
- III ☐ Concepto de sin fundamento con respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial
- IV ☐ Falta de unidad de invención
- V ☒ Declaración motivada de acuerdo con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; las citaciones y explicaciones ayudan a dicha declaración
- VI ☐ Ciertos documentos citados
- VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional
- VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

Fecha de presentación de la petición

26/11/2002

Fecha de terminación de este reporte

135

10.07.2003

Nombre y dirección de correspondencia de la autoridad
examinadora preliminar internacional:

European Patent Office - P.B: 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Póye Bas
Teléfono. + 31 70 340 - 240 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3060

Oficial Autorizado

Gonzalez Ramon, N

Teléfono No. +31 70 340 3456

Del PCT/1P2A/409 (hoja de portada) (enero 1994)

REPORTE DE EXAMEN**PRELIMINAR INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/EP02/05310

I. Bases del Reporte

1. Con respecto a los elementos de la solicitud internacional: (reemplazo de las hojas que han sido suministradas a la Oficina de recepción en respuesta a una invitación de acuerdo con el Artículo 14 se refieren a en este reporte como "presentadas originalmente" y no se anexan a este reporte ya que ellas no contienen correcciones (Reglas 70.16 y 70.17)):

Descripción, páginas:

1-28 como se presentó originalmente

Reivindicaciones, Números:

1-33 como se presentó originalmente

Dibujos, hojas:

1/15-15/15

como se presentó originalmente

2. Con respecto al idioma, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma en el que la solicitud internacional se presentó, a menos que se indique lo contrario de acuerdo con este ítem.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el siguiente idioma:

,que es:

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para propósitos de búsqueda internacional (de acuerdo con la regla 23.1(b)).
- ☐ el idioma de publicación de la solicitud internacional (de acuerdo con la regla 48.3(b)).

- ☐ el idioma de la traducción suministrado para propósitos de examen preliminar internacional (de acuerdo con la regla 55.2 y/o 55.3).

3. Con respecto a cualquier secuencia de ácido amino y/o nucleótido descrito en la solicitud internacional, el concepto escrito se emitió sobre la base de la lista de secuencia:

- ☐ Contenida en la solicitud internacional en forma impresa
- ☐ Presentada junto con la solicitud internacional en forma legible por computador
- ☐ Suministrada posteriormente a esta Autoridad en forma escrita
- ☐ Suministrada posteriormente a esta Autoridad en forma escrita forma legible por computador
- ☐ La declaración de que el listado de secuencias escrito suministrado posteriormente no va más allá de la descripción en la solicitud internacional como se presentó se ha suministrado.

- ☐ La declaración de que la información registrada en forma legible por computador es idéntica al listado de secuencias escrito que se ha suministrado.

4. Las correcciones han dado como resultado la cancelación de:

- | | |
|--|----------|
| ☐ la descripción, | páginas: |
| ☐ las reivindicaciones, | Nos.: |
| ☐ Los dibujos, | hojas: |

5. ☐ Este reporte ha sido emitido como si (algunas de) las correcciones no hubieran sido hechas, ya que ellas han sido consideradas que van más allá de la descripción como se presentó, como se indicó en la casilla complementaria (Regla 70.2(c)):

(Cualquier reemplazo de hojas que contengan dichas correcciones se debe referir de acuerdo al ítem 1 y anexadas a este reporte)

6. Observaciones adicionales, si es necesario:

MFO

III. Concepto de sin fundamento con respecto a novedad,
nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1. Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar un nivel inventivo (no ser obvio), o ser aplicable industrialmente no se han examinado con respecto a:

- ☐ La solicitud internacional completa
- ☒ Las reivindicaciones Nos. 1 - 11, 13 - 32 parcialmente, 33.

Porque:

- ☒ la dicha solicitud internacional, o las dichas reivindicaciones Nos. 25 - 29, 30 - 32 en relación a aplicabilidad industrial se relacionan a la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (especificar):

MA

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (elementos particulares indicados adelante) o dichas reivindicaciones Nos. Son tan no claras que ningún concepto que tenga sentido se puede formular (especificar):
- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. Son respaldadas tan inadecuadamente por la descripción que ningún concepto que tenga sentido se puede formular.
- ☒ ningún reporte de búsqueda internacional ha sido establecido para las dichas reivindicaciones Nos. 1 - 11, 31 - 32 parcialmente, 33.

2. Un examen preliminar internacional significativo no puede ser llevado a cabo debido a la interrupción del listado de secuencias de ácido amino y/o nucleótido para ajustarse con el estándar suministrado para en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas:

142

☐ la forma escrita no ha sido suministrada o no se ajusta con el estándar.

☐ la forma legible por computador no ha sido suministrada o no cumple con los estándares.

V. Declaración motivada de acuerdo con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; las citaciones y explicaciones ayudan tal declaración

1. Declaración

Novedad (N)

Si: Reivindicaciones

No: Reivindicaciones 1-3, 8, 13-29, 31

Nivel inventivo (IS)

Si: Reivindicaciones

No: Reivindicaciones 1-32

Aplicabilidad Industrial (IA)**Si: Reivindicaciones ver hoja separada****No: Reivindicaciones****2. Citaciones y Explicaciones****Ver hoja separada****Del FCT/IPEA/409 (Casillas I-VIII, hoja 3) (Julio 1996)**

144

REPORTE DE EXAMEN**PRELIMINAR INTERNACIONAL - HOJA SEPARADA**

Solicitud Internacional No.
PCT/EP02/05310

Re Item III

Concepto de sin fundamento con respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

Las reivindicaciones 25-28, 30-32 relacionan la materia objeto considerada por esta autoridad a ser cubierta por las disposiciones de la regla 67.1(IV) PCT. Por consiguiente, no se formulará concepto relacionado con aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) PCT).

La atención del solicitante se dirige al hecho de que las reivindicaciones, o parte de las reivindicaciones, relacionadas a la invención con respecto al cual no se ha establecido que ningún reporte de búsqueda internacional necesita ser objeto de un examen preliminar internacional (Regla 66.1(e) PCT). Se informa al solicitante que la política de la EPO cuando actúa como autoridad



examinadora preliminar internacional normalmente no llevar a cabo un examen preliminar sobre la materia que no ha sido buscada. Este es el caso aparte de si o no las reivindicaciones son corregidas siguiendo lo recibido por el reporte de búsqueda o durante cualquier procedimiento del capítulo II.

En la presente solicitud, la autoridad de búsqueda internacional ha restringido la búsqueda de acuerdo a las siguientes objeciones bajo los artículos 5 y 6 PCT:

Las presentes reivindicaciones 1-11, 13-33 relacionan un número extremadamente grande de posibles compuestos definidos como "polipéptido adecuado inmunologicamente" (reivindicaciones 1,19,20) "polipéptido conjugado" (reivindicación 19), "polipéptido inmunogénico derivado de ..." (reivindicación 11). Apoyo dentro del sentido del Artículo 6 PCT y descripción dentro del sentido del Artículo 5 PCT esta por ser encontrado, sin embargo, solo para una muy pequeña proporción de los compuestos reivindicados. En el presente caso, le falta apoyo a las reivindicaciones, y le falta descripción a la solicitud. Adicionalmente las presentes reivindicaciones 14-26,25-32 se relacionan a compuestos/métodos definidos mediante la

referencia a características deseables o propiedades, a saber: "el conjugado/vacuna elicit anticuerpos que unen..." (Reivindicaciones 14,15,29) "en una cantidad que es suficiente para elicit la respuesta de un anticuerpo" (reivindicación 25); "en una cantidad suficiente para inhibir..." (Reivindicaciones 30,31). Las reivindicaciones cubren todos los compuestos/métodos que tienen estas características o propiedades, por cuanto la solicitud suministra apoyo dentro del sentido del Artículo 6 PCT y la descripción dentro del sentido del Artículo 5 PCT solo para un número muy limitado de tales compuestos/métodos.

La reivindicación 33 no está soportada por la descripción (Artículo 6 PCT). Ninguna descripción está contenida en la presente solicitud para un kit de diagnóstico de inmuno ensayo como se reivindicó.

Solo se encontrará apoyo en la presente solicitud para aquellas partes de las reivindicaciones relacionadas a los compuestos preparados en los ejemplos y aquellos específicamente mencionados en las reivindicaciones 11,12 excluyendo las denominaciones vagas "polipéptido inmunogénico derivado de ...".

Independientemente del razonamiento anterior, a las reivindicaciones también les falta claridad (Artículo 6 PCT). Se hace un intento para definir el compuesto por la referencia de su perfil farmacológico: "polipéptido adecuado inmunológicamente" (reivindicaciones 1,19,20); "elicitación anticuerpos que unen un ..." (reivindicaciones 14,15); "en una cantidad que es suficiente para elicitación una respuesta de anticuerpos" (reivindicación 25); "en una cantidad suficiente para inhibir..." (Reivindicaciones 30,31).

Aquellos términos/expresiones son vagos y no claros y dejan al lector en duda así como también el significado de la característica técnica al cual esto se refiere, por lo tanto la interpretación de la definición materia objeto de dichas reivindicaciones no es clara (Artículo 6 PCT).

La autoridad examinadora preliminar internacional está completamente de acuerdo con estas objeciones, por lo tanto ningún examen preliminar internacional se llevará a cabo con respecto de la materia objeto que no está cubierta por el reporte de búsqueda (Regla 66.1(e) PCT)

148

Re Item V

Declaración motivada de acuerdo con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones apoyan tal declaración

Se dirige la atención del solicitante al hecho de que el presente concepto expresado como novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial solo se refiere a la materia objeto para el cual un reporte de búsqueda internacional se ha redactado (Regla 66.1(s) PCT); (es decir aquellas partes de las reivindicaciones relacionadas a los compuestos preparados en los ejemplos y aquellos mencionados específicamente en las reivindicaciones 11,12 excluyendo las de nominaciones vagas "péptido inmunogénico derivado de...")

Para la evaluación de las presente reivindicaciones 17,18,24-29,30,32 sobre la cuestión de si ellas son aplicables industrialmente no existe criterio unificado en los estados contratante del PCT.

La patentabilidad también puede ser dependiente de la formulación de las reivindicaciones. El EPO, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente la materia objeto de las reivindicaciones a el uso de un compuesto en tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicar a un compuesto conocido para primer uso en tratamiento médico y el uso de tal un compuesto para la manufactura de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Los siguientes documentos (D) se refieren a en este documento:

D1: FILLIT H M ET AL: JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 164, no. 3, 1986, páginas 762-776.

D2: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1997, no. 05, (1997-05-30) & JP 09 012600 A (SHISEIDO CO LTD), (1997-01-14).

D3: NO 99 62546 A (FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS SRL; PAVESIO ALESSANDRO (IT); CHIRON CO).

D4: US-A-5 866 135 (BLAKE MILAN S ET AL).

D5: O'HAGAN D T: JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, LONDON, GB, vol. 49, no 1, Enero 1998 (1998-01), página 1-10.

50

Novedad (Artículo 33(2) PCT)

La materia objeto de las reivindicaciones 1-3, 8, 13-29, 31 no es nueva en el sentido del Artículo 33(2) PCT. La razones por lo tanto son las siguientes:

D1 describe un conjugado y hialuronato (HA)-BSA utilizado como antígeno en un ELISA. Dichos anticuerpos contra HA-BSA también se describen en conejos será (ver tabla 1). Adicionalmente los presentes documentos evidencian que el epítoto de ácido glucurónico es responsable por reactividad del suero, y así la antigenicidad del ácido hialurónico conjugado (ver página 772, discusión párrafo 2). El incremento en antigenicidad se alcanza por hidrólisis enzimática parcial de ácido hialurónico representando un bajo peso molecular de ácido hialurónico, el mismo procedimiento como en la presente solicitud. Por consiguiente la materia objeto de las reivindicaciones 1-3, 9, 13-25, 27-29 no es novedoso en vista de D1.

D2 describe un anticuerpo monoclonal contra hialuronato de sodio obtenido mediante inmunización de un ratón con

una proteína (haemocianina) o un conjugado covalentemente o un fosfolípido conjugado covalentemente a un peso molecular reducido de hialuronato (ver resumen). Dicho hialuronato de bajo peso molecular, aunque no especificado en términos moleculares se abarcará bajo un amplio rango de peso molecular de la presente reivindicación 3. Por consiguiente la materia objeto de las reivindicaciones 1-3, 8, 13-19, 21-29 no es nueva en vista de D2.

D3 describe el uso de polímeros de ácido hialurónico para administración mucosa de vacuna de antígenos que incluyen difteria, tétano, pertusis, meningitis (ver página 13, líneas 28-30). Aunque las composiciones utilizadas para inmunización comprenden los antígenos en una forma adsorbida o entrapada con el ácido hialurónico, y no como un conjugado covalente (ver reivindicaciones 1, 8-10), los anticuerpos elicitados con la composición, como ellos reaccionan contra los mismos epítopes de la presente solicitud, inevitablemente caen dentro del alcance de las presentes reivindicaciones 21, 24, 31. Por consiguiente la materia objeto de las reivindicaciones 21-24, 31 no es novedosa de acuerdo con D3.

Nivel Inventivo (Artículo 33(3) PCT)

La materia objeto de la presentes reivindicaciones 1-3, 8, 13-29, 31 distan de ser novedosas y las reivindicaciones 4-7, 9-12, 30, 32 no presentan los requerimientos del artículo 33() PCT por las siguientes razones:

De acuerdo con la descripción (pagina 2 líneas 12-14) el problema resaltado de la presente invención es la prevención y tratamiento de patógenos gram positivos tales como estreptococo por medio de inmunización (es decir vacuna) como solución al problema un conjugado inmunogénico comprende ácido hialurónico enlazado covalentemente a un portador polipéptido (toxoides de tétano, toxoides de difteria, toxoides pertussis, polipéptido estreptococo, polipéptido influenza, polipéptido meningococo, polipéptido neumococo e E. coli) se propone. Adicionalmente un método de preparación de dichos conjugados y anticuerpos elicitados contra dichos immunoconjugados también se abarca.

El documento D4, que puede ser considerado el estado más cercano de la técnica por la evaluación del nivel

inventivo ya dirigía el problema de la prevención de patógenos gram positivos, en particular el grupo A estreptococo por medio de inmunización (vacunación) con composiciones que contienen polisacáridos estreptococo covalentemente unidos a una proteína bacterial que incluyen toxoide tetanus, toxina de cólera, toxina de difteria (ver reivindicaciones 3,22-24).

La diferencia entre D4 y la materia objeto de la presente solicitud es el hecho de que el ácido hialurónico no se menciona entre los polisacárido estreptococos formadores del conjugado con los toxoides de polipéptido y las toxinas.

Consecuentemente el problema a ser resuelto sobre D4 sería el mejoramiento de los conjugados de polisacáridos utilizados para inmunización/vacunación contra patógenos gram positivos.

Parte de las formas de ácido hialurónico de los polisacáridos estreptococo (como se establece en la descripción pagina 2 línea 2 y los documentos referidos por el solicitante en la pagina 2, línea 5-11). El experto en vista de la enseñanza de D4 en la prevención y

/57

el tratamiento de patógenos gran positivos (en particular estreptococo del grupo A), por inmunización con un conjugado de un polisacárido estreptococo con un toxoide polipéptido, podría tratar, con esperanza de éxito, la solicitud de dicha enseñanza a la preparación de conjugado de ácido hialurónico, tomando en cuenta la enseñanza de D2 en donde los conjugados covalente del ácido hialurónico con polipéptidos, elicitó una respuesta inmune contra dicho ácido hialurónico.

En particular se podría seleccionar ácido hialurónico de bajo peso molecular como el tipo más apropiado de ácido hialurónico para producir una respuesta inmune en vista de la enseñanza de D1 discutido previamente.

Obviamente el uso propuesto de un conjugado inmune es inmunización o vacunación así como inevitablemente la producción de anticuerpos. Por consiguiente los anticuerpos elicitados contra inmuno-conjugados como se reivindica en las reivindicaciones 21-23 no pueden ser ni considerados como que involucren un nivel inventivo, por otra parte, como conjugados polisacáridos para portadores de proteína normalmente tétano o toxoide de difteria se

153

sugiere como estrategia en desarrollo de vacunas (ver D5, pagina 2, columna 2 y tabla 3).

Las vacunas comprenden los inmuno-conjugados (reivindicación 29) son por consiguiente también obvios para el experto en vista de D5 por la misma razón anterior.

Adicionalmente el método de preparar dicho conjugado polipéptido - ácido hialurónico de bajo peso molecular consiste en utilizar cianoborhidruro de sodio (descripción pagina 21 de la presente solicitud), como una técnica rutinaria para conjugación de polisacáridos a polipéptidos, no puede ser ni considerada como una característica que confiere nivel inventivo a la materia objeto de las reivindicaciones 19,20.



FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Royal
Technologies S.A.
Procesamiento de documentos

Expediente No		03099742	No de Folia
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA	1	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones: Arte final

17

Superintendencia y Comercio
Radicación: 03099742 00000000
Fecha (GEM): 2003-11-11 17:44:19
Folios: 157
Trámite: 011 PCT-PATENT 373 PASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 78,176
FECHA : OCTUBRE 27 DE 2003

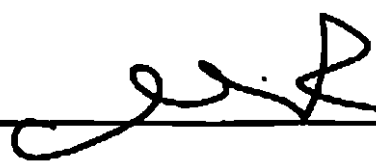
CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	19534392	27/10/2003	38,496,690.00

CONCEPTO

CANT. CONTABILITIVA	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL :	400,000.00

SOL: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Cdo 13936-841-002-9

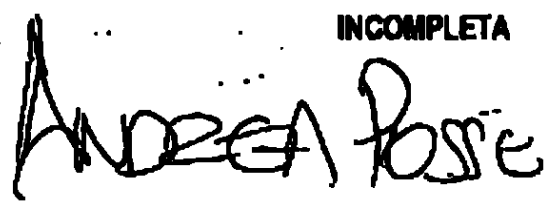
158 30 158
130

SUPERINTENDENCIA Y CONTROL
Radicación : 03993742 00000000 Folio: 157
Fecha (EMB): 2012-11-11 17:44:19
Trámite : 011 DCI-PAITEM 375 FASE INCI 411 PRESENTAR
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRANMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒ MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.		()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.		()
- Descripción de la invención.		()
- Dibujos de ser estos pertinentes.		()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:



Fecha:

Folia 179 a/182
Exhausto publicações



2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
Emilio Ferrero
Apoderado
Baxter International INC y Baxter Healthcare SA.

Oficio N°
01172

ASUNTO:	Radicación N°	03-89742
	Solicitud Internacional	PCT/EP2002/05310
	Fecha inicio fase nacional	11/12/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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

- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 28-k) Decisión 486).
- ☐ La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredite la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 38 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 anunciados. 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 a), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefa de la División de Nuevas Creaciones.

30 ENE. 2004

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

WHA