

B.T.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

05-7265

54. TITULO **"COMPOSICION DE VACUNA QUE COMPRENDE
PROTEINA DE ENLACE DE TRANSFERRINA Y HSF DE
BACTERIA GRAM-NEGATIVA"**

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL **A61K 39/095**

71. SOLICITANTE **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

DOMICILIO **RIXENSART, BELGICA.**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTA, D.C. **28 ENE 2005**

(FORMA P 10)

✓

PETITORIO


Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación : 05007265 00000000 Folios: 137
 Fecha (MM): 2005-01-28 15:29:09
 Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NAC1 411 PRESENTM
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
 PCT**

ENTRADA EN FASE NACIONAL 02 - Marzo - 2005

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

**SOLICITANTE
 (71)**

Nombre: **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS
 S.A.**

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

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart, Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica.

Teléfono: 3284270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

**REPRESENTANTE
 APODERADO**

Nombre: **ALICIA LLORED RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
 Bogotá- Colombia

Teléfono: 3284270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número 39.890.713 TP 53.215

④

**INVENTOR(ES)
 (72)**

Nombre: BERTHET, Francois-Xavier, Jacques; BIEMANS, Ralph; DENOEL, Philippe; FERON, Christiane; GORAJ, Karine; POOLMAN, Jan y WEYNANTS, Vincent.

Dirección: GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart.

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2003/008567

Fecha: 31/07/03

Publicación Internacional No. WO 2004/014419 A1

Fecha: 19/02/04

⑥

**Título (54) "COMPOSICION DE VACUNA QUE COMPRENDE PROTEINA DE ENLACE
 DE TRANSFERRINA Y HSF DE BACTERIA GRAM-NEGATIVA"**

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/095

⑧

Prioridad

SI ☒NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

GB GB

02/08/02 02/08/02

0218037.0 0218038.2

GB GB

02/08/02 02/08/02

0218035.4 0218051.1

GB GB

30/08/02 30/08/02

0220197.8 0220199.4

GB GB

01/11/02 01/11/02

0225524.8 0225531.3

GB GB

24/12/02 24/12/02

0230184.8 0230188.7

GB GB

24/12/02 05/03/03

0230170.3 0305028.3

⑨

Comprobante de Pago No. 05-5,627

Fecha: Enero 28 de 2005

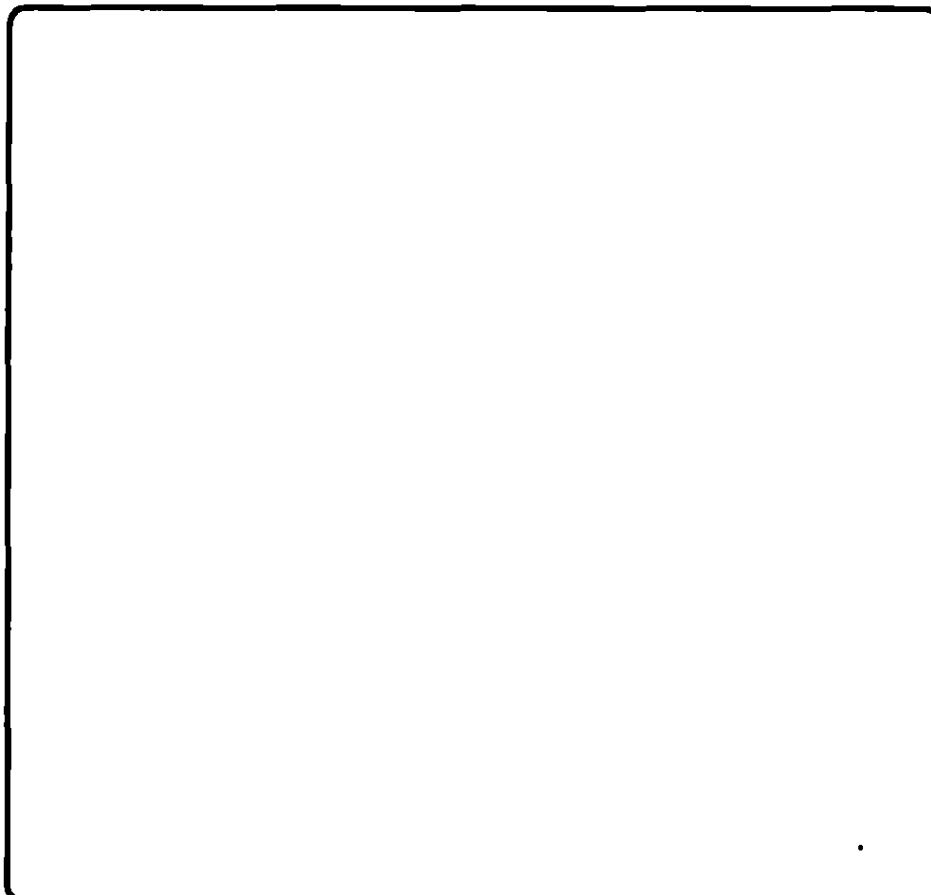
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros reporte de búsqueda internacional con su traducción y publicación con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLORED A RICAURTE

FIRMA:

Alicia Lloreda Ricaurte

C.C. 39.680.713 Uuaquén T.P. 53.215

2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 05007265 00000000 Folios: 137
Fecha (MIB): 2005-01-26 15:49:09
Tramite : 011 DCI-PATENT 379 FASE TRES 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 3,627
FECHA : ENERO 26 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	30342303	26/01/2005	2,313,600.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
	TOTAL :	443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

3

4

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-09-466
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español.

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

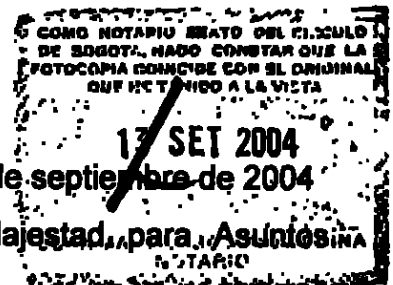
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 01 de septiembre de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: G 749037
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: (ilegible)



TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260567
Ita Esobar

HA APARECIDO EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS SITUACIONES INDICADAS
13 SET 2004
JUAN MA MEDINA
NOTARIO

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

UES
JEFE DE LEGALIZACIONES
LEGOTA D.C.

Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

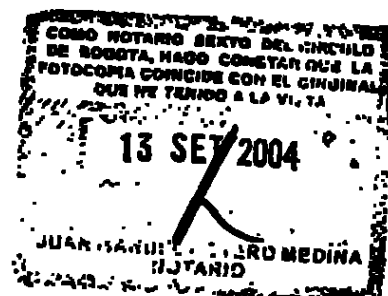
W. Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es auténtica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

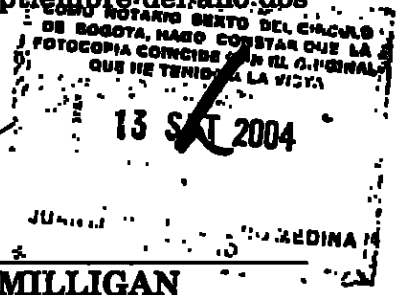
CERTIFICO:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada **"GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A."** (anteriormente denominada **"Smithkline Beecham Biologicals s.a."**), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

QUE el citado Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre de año dos mil cuatro.



JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



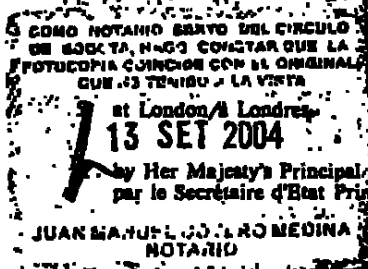
APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by James Keer Milligan
a été signé par
3. acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. bears the seal/stamp of Notar, Futur
est revêtu du sceau/timbre de



Certified/Attesté

6. the/le 01 SEP 2004

8. Number/sous No **G 749037**

9. Stamp:
timbre:



10. Signature W GLASS

W Glass
For the Secretary of State/ Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is
not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the
mission representing that country.

Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BI LOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica.

con domicilio en **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Bélgica**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 8o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, perclbir y apelar, con todas las demás facultades que resultan necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, **GLAX SMITHKLINE BI LOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Belgium**

hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this

Marcus Jonathan William DALTON
Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorized Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

31 AUG 2004

13 SET 2004

NOTARY MEDINA

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A., la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Bélgica, domiciliada en la ciudad de Rixensart, Bélgica, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de

que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder, que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

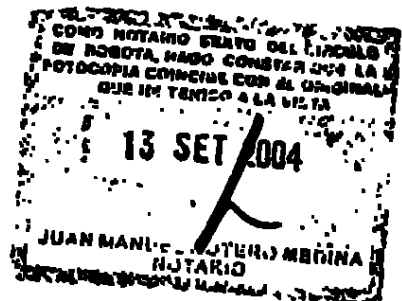
On this day of , 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing Instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

of GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A., the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Belgium, domiciled at the City of Rixensart, Belgium, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of

, that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney, that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at , under date of

and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.



8

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

No. SOLICITUD INTERNACIONAL : PCT/EP2003/008567

(51) INT. CL.: A61K 39/095

(21) No. SOLICITUD:

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: 28-01-2005

(71) SOLICITANTE: GLAXOSMITHKLINE
BIOLOGICALS S.A.

(30) PRIORIDAD: 0218037.0 0218036.2
0218035.4 0218051.1

(31) No. DE SOLICITUD: 0220197.8 0220199.4
0225524.8 0225531.3
0230164.6 0230168.7
0230170.3 0305028.3

(72) INVENTORES: BERTHET, Francois-Xavier,
Jacques; BIEMANS, Ralph;
DENOEL, Philippe; FERON,
Christiane; GORAJ, Karine;
POOLMAN, Jan y WEYNANTS,
Vincent.

(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: 02-08-2002 02-08-2002
02-08-2002 02-08-2002
30-08-2002 30-08-2002
01-11-2002 01-11-2002

(74) REPRESENTANTE LEGAL: ALICIA LLORED A RICAURTE

(33) PAÍS: 24-12-2002 24-12-2002
24-12-2002 05-03-2003
GB

(54) TÍTULO:

"COMPOSICION DE VACUNA QUE COMPRENDE PROTEINA DE ENLACE DE TRANSFERRINA Y HSF DE BACTERIA GRAM-NEGATIVA"

(57) RESUMEN:

Reivindicación número 1.-

Una composición inmunogénica que comprende una proteína de enlace a transferrina aislada (Tbp) o fragmento antigénico de la misma y una proteína similar a Hsf aislada o un fragmento antigénico de la misma procedente de la misma bacteria Gram negativa o una diferente.

Reivindicación número 55.-

Una vacuna que comprende la composición Inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones 1 a 54 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Reivindicación número 61.-

Un método para elaborar la composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque comprende un paso de mezclar junta la proteína de enlace a transferrina aislada y la proteína similar a Hsf aislada o fragmentos antigénicos de las mismas.

10

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente CLJ/B45314	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación de Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/EP 03/08567	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 31/07/2003	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 02/08/2002
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 6 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ la búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la lista de la secuencia:

☐ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.

☐ presentada junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.

☒ proporcionada subsecuentemente a esta Autoridad en forma escrita.

☒ proporcionada subsecuentemente a esta Autoridad en forma legible por computador.

☒ se ha proporcionado la afirmación de que el listado de secuencias escrito proporcionado subsecuentemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.

☒ se ha proporcionado la afirmación de que la información registrada en forma legible por computador es idéntica al listado de la secuencia escrita.

2. ☒ Claras reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla I).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Casilla II).

4. Respecto al título,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☒ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

COMPOSICION DE VACUNA QUE COMPRENDE PROTEINA DE ENLACE DE TRANSFERRINA Y HSF DE BACTERIA GRAM-NEGATIVA

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Regla 38.2(b), según aparece en la Casilla III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No.

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

☒ Ninguna de las figuras.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08567**Castilla I Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 1 de la primera hoja)**

Este Reporte de Búsqueda Internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:
Aunque las reivindicaciones 56, 57, 70 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.

2. ☒ Reivindicaciones Nos.: -
porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
ver INFORMACION ADICIONAL hoja PCT/ISA/2103. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Castilla II Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.

☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

CONTINUACION DE INFORMACION ADICIONAL PCT/ISA/210

Continuación de la Casilla I.2

Las presentes reivindicaciones 1, 20, 21, 26-32, 35-43, 45-48, 51-56, 58, 60 se identifican con un número extremadamente grande de composiciones inmunogénicas posibles y cepas bacterianas. Se debe encontrar apoyo dentro del significado del Artículo 6 PCT y/o divulgación dentro del significado del Artículo 5 PCT; sin embargo, sólo para una pequeña proporción de composiciones inmunogénicas y cepas bacterianas reivindicadas. En el presente caso, las reivindicaciones carecen de apoyo, y la solicitud carece tanto de divulgación que es imposible una búsqueda significativa sobre todo el alcance reivindicado. En consecuencia, la búsqueda se ha llevado a cabo para aquellas partes de las reivindicaciones que parecen estar soportadas y divulgadas, especialmente aquellas partes que se relacionan con las composiciones inmunogénicas que comprenden proteínas o vesículas de membrana externa derivadas de *Neisseria*, *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae* (ver ejemplos y especificación página 12, último párrafo – página 14, párrafo 2).

Las presentes reivindicaciones 1-14, 16, 18, 20-43, 45-48, 51-71 identifican a compuestos definidos por referencia con una característica o propiedad deseable, especialmente siendo una proteína del tipo Hsf o tal como está definido en la especificación en la página 9, línea 3.4, que comparte la homología con el Hsf de *Neisseria meningitidis*.

Las reivindicaciones cubren todos los compuestos que tienen esta característica o propiedad, en donde la solicitud provee apoyo dentro del significado del Artículo 6 PCT y/o divulgación dentro del significado del Artículo 5 PCT para solo un número limitado de dichos compuestos. En el presente caso, las reivindicaciones carecen tanto de apoyo, como de divulgación, que una búsqueda significativa sobre la totalidad del alcance reivindicado sería imposible. Independientemente del razonamiento anterior, las reivindicaciones también carecen de claridad (Artículo 6 PCT). En consecuencia, la búsqueda fue realizada para aquellas partes de las reivindicaciones que parecen ser claras, soportadas o divulgadas, especialmente aquellas partes que se relacionan con los compuestos divulgados en la especificación de la página 9, línea 11-25.

Se llama la atención del solicitante sobre el hecho que reivindicaciones o partes de éstas que relacionan a las invenciones con respecto de las cuales no se ha establecido ningún reporte de búsqueda que necesite ser objeto de un examen preliminar internacional (Regla 66.1 (e) PCT). Se advierte al solicitante que la política EPO cuando se actúa como una Autoridad de Examen Preliminar Internacional normalmente no lleva a cabo un examen preliminar sobre un asunto que no ha sido investigado. Este es el caso sin tomar en consideración si las reivindicaciones son o no modificadas posterior al recibo del reporte de búsqueda o durante cualesquier procedimiento del Capítulo II.

12

74

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08567

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO

IPC 7 A61K39/095 A61K39/102 A61K39/00

Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 A61K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Internacional, WPI Dato, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 01 09350 A (DALEMANS WILFRIED L J; SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG (BE); THIRY GEORG) 8 de Febrero de 2001 (2001-02-08) citado en la solicitud resumen página 12, línea 32 - página 13, línea 14 página 14, línea 12 - línea 22 página 20, línea 11 - línea 22 página 23, línea 21 - página 24, línea 7 página 25, línea 11 - página 27, línea 22 página 31, línea 1 - línea 22 página 31, línea 30 - página 32 página 33, línea 12 - línea 30 página 36, línea 11 - línea 19 ejemplo 8	20-25, 27-45, 51-63, 65

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'T' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'Z' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

9 de Enero de 2004

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

20/01/2004

Nombre y dirección de correo de la ISA
Oficina de Patentes Europeas, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Noë, V

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08567

14

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	WO 00 71725 A (PIZZA MARIAGRAZIA; RAPPUOLI RINO (IT); CHIRON SPA (IT); GIULIANI M) 30 de Noviembre de 2000 (2000-11-30) citado en la solicitud resumen página 55, línea 1-3	1-8, 13, 14, 16-19, 48-51, 55-59, 61-65
A	WO 00 25811 A (GORRINGE ANDREW RICHARD; HUDSON MICHAEL JOHN (GB); MICROBIOLOGICAL) 11 de Mayo de 2000 (2000-05-11) citado en la solicitud resumen página 1, párrafo 1 página 3, último párrafo - página 4, párrafo 1 página 5, párrafo 4 - página 6, párrafo 1 párrafo 6, párrafo 3 página 7, párrafo 5 - página 8, párrafo 1 reivindicaciones 1, 10-16, 27, 32	
A	WO 99 31132 A (JENNINGS MICHAEL PAUL; PEAK IAN RICHARD ANSELM (AU); UNIV QUEENSLA) 24 de Junio de 1999 (1999-06-24) citado en la solicitud resumen página 34, línea 10 - página 40, línea 17 reivindicaciones 1-11, 20, 21, 29-33	1-19, 48-52, 55-59, 66-71
A	WO 01 72337 A (GORRINGE ANDREW RICHARD; HUDSON MICHAEL JOHN (GB); MICROBIOLOGICAL) 4 de Octubre de 2001 (2001-10-04) resumen página 5, línea 14 - línea 26 página 7, línea 21 - página 8, línea 10 página 10, línea 6 - línea 37	1-3, 5-10, 13, 14, 16-19, 46, 47, 64
A	MATHERS K Y COL: "RESPUESTA DEL ANTICUERPO A LAS PROTEINAS EXTERNAS DE LA MEMBRANA DE MORAXELLA CATARRHALIS EN NIÑOS CON OTTIS MEDIA" PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL, WILLIAMS & WILKINS, BALTIMORE, MD, US, Vol. 18, No. 11, Noviembre de 1999 (1999-11), páginas 982-988, XP009003591 ISSN: 0891-3668 resumen	

X6

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.

PCT/EP 03/08567

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
WO 0109350 A	08-02-2001	AU	6833600 A	19-02-2001
		BR	0012974 A	07-05-2002
		CA	2380840 A1	08-02-2001
		CN	1377415 T	30-10-2002
		CZ	20020403 A3	15-05-2002
		WO	0109350 A2	08-02-2001
		EP	1208214 A2	29-05-2002
		HU	0203056 A2	28-12-2002
		JP	2003506049 T	18-02-2003
		NO	20020506 A	02-04-2002
		TR	200200275 T2	21-05-2002
		TR	200202448 T2	21-01-2003
WO 0071725 A	30-11-2000	AU	5097700 A	12-12-2000
		BR	0010721 A	11-06-2002
		CA	2373236 A1	30-11-2000
		CN	1362992 T	07-08-2002
		EP	1179072 A2	13-02-2002
		WO	0071725 A2	30-11-2000
		JP	2003500420 T	07-01-2003
WO 0025811 A	11-05-2000	AT	242640 T	15-06-2003
		AU	760858 B2	22-05-2003
		AU	1056900 A	22-05-2000
		BR	9914946 A	10-07-2001
		CA	2349331 A1	11-05-2000
		DE	69908805 D1	17-07-2003
		DK	1126874 T3	29-09-2003
		EP	1297844 A2	02-04-2003
		EP	1126874 A2	29-08-2001
		WO	0025811 A2	11-05-2000
		JP	2002528515 T	03-09-2002
		US	2003215469 A1	20-11-2003
WO 9931132 A	24-06-1999	AU	747742 B2	23-05-2002
		AU	1649599 A	05-07-1999
		WO	9931132 A1	24-06-1999
		BR	9814276 A	03-10-2000
		CA	2314319 A1	24-06-1999
		CN	1284965 T	21-02-2001
		EP	1045859 A1	25-10-2000
		HU	0100094 A2	28-05-2001
		JP	2002508394 T	19-03-2002
		NO	20002990 A	08-08-2000
		NZ	505374 A	01-03-2002
		PL	341160 A1	26-03-2001
		TR	200001709 T2	21-03-2001
		US	6495345 B1	17-12-2002
		US	2002102276 A1	01-08-2002
WO 0172337 A	04-10-2001	AU	4260201 A	08-10-2001
		CA	2403993 A1	04-10-2001
		EP	1267938 A1	02-01-2003
		WO	01723337 A1	04-10-2001
		JP	2003528157 T	24-09-2003
		US	2003082211 A1	01-05-2003

PCT

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

To: GLAXOSMITHKLINE GSK House Attn. Stephen, Roberts 980 Great West Road Brentford Middlesex TW8 9EP UNITED KINGDOM		GlaxoSmithKline Corporate IP Received BRENTFORD 19 JAN 2004	
Applicant's or agent's file reference CLJ/B45314		Date of mailing (day/month/year) 20/01/2004	
International application No. PCT/EP 03/08567		International filing date (day/month/year) 31/07/2003	
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International Search Report has been established and is transmitted herewith.
Filing of amendments and statement under Article 19:
The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 48):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no International Search Report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Further action(s): The applicant is reminded of the following:

Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within 19 months from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later).

Within 20 months from the priority date, the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 19 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Marilú Masserut
--	---------------------------------------

XB

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

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

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the letter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

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

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

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 18 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

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

How?

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

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

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

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

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

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

A

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

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

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

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

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

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

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

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

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

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

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

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

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

If, at the time of filing any amendments under Article 18, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

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

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 18 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

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

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference CLJ/B45314	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP 03/08567	International filing date (day/month/year) 31/07/2003	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 02/08/2002
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

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

This International Search Report consists of a total of 6 sheets.

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

1. Basis of the report

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

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

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

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☒ furnished subsequently to this Authority in written form.

☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☒ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☒ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

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

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

4. With regard to the title,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

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

VACCINE COMPOSITION COMPRISING TRANSFERRIN BINDING PROTEIN AND HSF FROM GRAM NEGATIVE BACTERIA

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

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

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

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/08567

20

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

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

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 56,57,70 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

22

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 1,20,21,26-32,35-43,45-48,51-56,58,60 relate to an extremely large number of possible immunogenic compositions and bacterial strains. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the immunogenic compositions and bacterial strains claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the immunogenic compositions comprising proteins or outer membrane vesicles derived from *Neisseria*, *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae* (see examples and description page 12, last paragraph -page 14, paragraph 2).

Present claims 1-14, 16,18,20-43,45-48,51-71 relate to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being a Hsf like protein or as defined in the description on page 9, line 3-4, sharing homology with Hsf of *Neisseria meningitidis*. The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds disclosed in the description on page 9, line 11-25.

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08567

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/095 A61K39/102 A61K39/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 09350 A (DALEMANS WILFRIED L J ;SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG (BE); THIRY GEORG) 8 February 2001 (2001-02-08) cited in the application abstract page 12, line 32 -page 13, line 14 page 14, line 12 - line 22 page 20, line 11 - line 22 page 23, line 21 -page 24, line 7 page 25, line 11 -page 27, line 22 page 31, line 1 - line 22 page 31, line 30 -page 32 page 33, line 12 - line 30 page 36, line 11 - line 19 example 8 --- -/--	20-25, 27-45, 51-63,65



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 January 2004

Date of mailing of the international search report

20/01/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkanal 2
NL - 2280 LV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Noë, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08567

23

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 71725 A (PIZZA MARIAGRAZIA ;RAPPUOLI RINO (IT); CHIRON SPA (IT); GIULIANI M) 30 November 2000 (2000-11-30) cited in the application abstract page 55, line 1-3	1-8,13, 14, 16-19, 48-51, 55-59, 61,65
A	WO 00 25811 A (GORRINGE ANDREW RICHARD ;HUDSON MICHAEL JOHN (GB); MICROBIOLOGICAL) 11 May 2000 (2000-05-11) cited in the application abstract page 1, paragraph 1 page 3, last paragraph -page 4, paragraph 1 page 5, paragraph 4 -page 6, paragraph 1 page 6, paragraph 3 page 7, paragraph 5 -page 8, paragraph 1 claims 1,10-16,27,32	
A	WO 99 31132 A (JENNINGS MICHAEL PAUL ;PEAK IAN RICHARD ANSELM (AU); UNIV QUEENSLA) 24 June 1999 (1999-06-24) cited in the application abstract page 34, line 10 -page 40, line 17 claims 1-11,20,21,29-33	1-19, 48-52, 55-59, 66-71
A	WO 01 72337 A (GORRINGE ANDREW RICHARD ;HUDSON MICHAEL JOHN (GB); MICROBIOLOGICAL) 4 October 2001 (2001-10-04) abstract page 5, line 14 - line 26 page 7, line 21 -page 8, line 10 page 10, line 6 - line 37	1-3, 5-10,13, 14, 16-19, 46,47,64
A	MATHERS K ET AL: "ANTIBODY RESPONSE TO OUTER MEMBRANE PROTEINS OF MORAXELLA CATARRHALIS IN CHILDREN WITH OTITIS MEDIA" PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL, WILLIAMS & WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 18, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 982-988, XP009003591 ISSN: 0891-3668 abstract	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/08567

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0109350 A	08-02-2001	AU 6833600 A	19-02-2001
		BR 0012974 A	07-05-2002
		CA 2380840 A1	08-02-2001
		CN 1377415 T	30-10-2002
		CZ 20020403 A3	15-05-2002
		WO 0109350 A2	08-02-2001
		EP 1208214 A2	29-05-2002
		HU 0203056 A2	28-12-2002
		JP 2003506049 T	18-02-2003
		NO 20020506 A	02-04-2002
		TR 200200275 T2	21-05-2002
		TR 200202448 T2	21-01-2003
WO 0071725 A	30-11-2000	AU 5097700 A	12-12-2000
		BR 0010721 A	11-06-2002
		CA 2373236 A1	30-11-2000
		CN 1362992 T	07-08-2002
		EP 1179072 A2	13-02-2002
		WO 0071725 A2	30-11-2000
		JP 2003500420 T	07-01-2003
WO 0025811 A	11-05-2000	AT 242640 T	15-06-2003
		AU 760858 B2	22-05-2003
		AU 1056900 A	22-05-2000
		BR 9914946 A	10-07-2001
		CA 2349331 A1	11-05-2000
		DE 69908805 D1	17-07-2003
		DK 1126874 T3	29-09-2003
		EP 1297844 A2	02-04-2003
		EP 1126874 A2	29-08-2001
		WO 0025811 A2	11-05-2000
		JP 2002528515 T	03-09-2002
		US 2003215469 A1	20-11-2003
WO 9931132 A	24-06-1999	AU 747742 B2	23-05-2002
		AU 1649599 A	05-07-1999
		WO 9931132 A1	24-06-1999
		BR 9814276 A	03-10-2000
		CA 2314319 A1	24-06-1999
		CN 1284965 T	21-02-2001
		EP 1045859 A1	25-10-2000
		HU 0100094 A2	28-05-2001
		JP 2002508394 T	19-03-2002
		NO 20002990 A	08-08-2000
		NZ 505374 A	01-03-2002
		PL 341160 A1	26-03-2001
		TR 200001709 T2	21-03-2001
		US 6495345 B1	17-12-2002
		US 2002102276 A1	01-08-2002
WO 0172337 A	04-10-2001	AU 4260201 A	08-10-2001
		CA 2403993 A1	04-10-2001
		EP 1267938 A1	02-01-2003
		WO 0172337 A1	04-10-2001
		JP 2003528157 T	24-09-2003
		US 2003082211 A1	01-05-2003

25

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
19 de Febrero de 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/014419 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 39/095,
39/102, 39/00

(74) Agente: STEPHEN, Robert; GlaxoSmithKline, GSK House, 980
Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2003/ 008567

(81) Estados Designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(22) Fecha de Registro Internacional: 31 de Julio de 2003
(31.07.2003)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:

0218037.0	2 de Agosto de 2002 (02.08.2002)	GB
0218036.2	2 de Agosto de 2002 (02.08.2002)	GB
0218035.4	2 de Agosto de 2002 (02.08.2002)	GB
0218051.1	2 de Agosto de 2002 (02.08.2002)	GB
0220197.8	30 de Agosto de 2002 (30.08.2002)	GB
0220199.4	30 de Agosto de 2002 (30.08.2002)	GB
0225524.8	1 de Noviembre de 2002 (01.11.2002)	GB
0225531.3	1 de Noviembre de 2002 (01.11.2002)	GB
0230164.6	24 de Diciembre de 2002 (24.12.2002)	GB
0230168.7	24 de Diciembre de 2002 (24.12.2002)	GB
0230170.3	24 de Diciembre de 2002 (24.12.2002)	GB
0305028.3	5 de Marzo de 2003 (05.03.2003)	GB

(84) Estados Designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasiática
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar
las reivindicaciones y ser republicada de nuevo en el caso de
recibo de modificaciones

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas
Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada
edición regular de la Gaceta PCT.

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados
Unidos de América): GLAXOSMITHKLINE
BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart Brussels (BE).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América
solamente): BERTHET, Francois-Xavier, Jacques
[FR/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de
l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE).
BIEMANS, Ralph [BE/BE]; GlaxoSmithKline
Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart
Brussels (BE). DENOEL, Philippe [BE/BE];
GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart Brussels (BE). FERON, Christiane
[BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de
l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). GORAJ,
Carline [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A.,
Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE).
POOLMAN, Jan [NL/BE]; GlaxoSmithKline
Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart
Brussels (BE). WEYNANTS, Vincent [BE/BE];
GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart Brussels (BE).

(54) Título: COMPOSICION DE VACUNA QUE COMPRENDE PROTEINA DE ENLACE DE TRANSFERRINA Y HSF DE
BACTERIA GRAM-NEGATIVA

(57) Resumen: La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas y vacunas para la prevención o tratamiento de
infección por bacteria Gram negativa. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención, comprenden proteína de
enlace a transferrina y Hsf, y la combinación de estos dos antígenos ha mostrado actuar en forma sinérgica para producir
anticuerpos con actividad superior en un ensayo bactericida de suero. Esta combinación de antígenos es útil para utilizarse en
vacunas contra *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae*.

27

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 February 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/014419 A1

(51) International Patent Classification: A61K 39/095,
39/102, 39/00

(21) International Application Number:
PCT/EP2003/008567

(22) International Filing Date: 31 July 2003 (31.07.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

[BI/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). GORAJ, Carline [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). POOLMAN, Jan [NL/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). WUYNANTS, Vincent [BI/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE).

(74) Agent: STEPHEN, Robert; GlaxoSmithKline, GSK House, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).

(30) Priority Date:

0218037.0 /	2 August 2002 (02.08.2002)	GB
0218036.2 /	2 August 2002 (02.08.2002)	GB
0218035.4 /	2 August 2002 (02.08.2002)	GB
0218051.1 /	2 August 2002 (02.08.2002)	GB
0220197.8 /	30 August 2002 (30.08.2002)	GB
0220199.4 /	30 August 2002 (30.08.2002)	GB
0225534.8 /	1 November 2002 (01.11.2002)	GB
0225531.3 /	1 November 2002 (01.11.2002)	GB
0230164.6 /	24 December 2002 (24.12.2002)	GB
0230168.7 /	24 December 2002 (24.12.2002)	GB
0230170.3 /	24 December 2002 (24.12.2002)	GB
0305028.3 /	5 March 2003 (05.03.2003)	GB

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HN, 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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

(71) Applicant (for all designated States except US): GLAXO-SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventor/Applicants (for US only): BERTHET, Francois-Xavier, Jacques [FR/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). BIEMANS, Ralph [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). DENOEL, Philippe [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). FERON, Christine

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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

(54) Title: VACCINE COMPOSITION COMPRISING TRANSFERRIN BINDING PROTEIN AND HSF FROM GRAM NEGATIVE BACTERIA

(57) Abstract: The present invention relates to immunogenic compositions and vaccines for the prevention or treatment of Gram negative bacterial infection. Immunogenic compositions of the invention comprise transferrin binding protein and Hsf, and the combination of these two antigens have been shown to act synergistically to produce antibodies with high activity in a serum bactericidal assay. This combination of antigens is useful for use in vaccines against *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae*.

WO 2004/014419 A1

27

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente CLJ/B45314	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Notificación de Transmisión del Reporte de Examen Preliminar Internacional (Forma PCT/IPEA/416)	
Solicitud internacional No. PCT/EP03/08567	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 31.07.2003	Fecha de prioridad (día/mes/año) 02.08.2002
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC A61K39/095		
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. y col.		

1. Este reporte de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>7</u> hojas, incluyendo esta carátula. ☐ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base para este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT). Estos anexos constan de un total de hojas.	
3. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: I ☒ Bases del reporte II ☐ Prioridad III ☒ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial IV ☐ Falta de unidad de invención V ☒ Afirmación razonada según Regla 66.2(a)(ii) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional	
Fecha de presentación de la demanda 18.02.2004	Fecha de terminación de este reporte 25.06.2004
Nombre y dirección de correo de la autoridad de examen preliminar internacional: Oficina de Patentes Europea-P.B. 5818 Patentaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Funcionario autorizado Noë, V Teléfono No. +31 70 340-4181

I. Bases del reporte

1. Respecto a los elementos de la solicitud internacional: (Hojas de remplazo las cuales han sido suministradas a la Oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el Artículo 14 están referenciados en este reporte como "presentados originalmente" y no están anexos a este reporte dado que no contienen modificaciones (Reglas 70.16 y 70.17):

Descripción, Páginas

1-51 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, Números

1-71 como se presentaron originalmente

Dibujos, Hojas

1/1 como se presentaron originalmente

2. Respecto al idioma, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma en el cual la solicitud internacional fue presentada, a menos que se indique lo contrario bajo este ítem.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma: , el cual es:

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para una búsqueda internacional (según la Regla 23.1 (b)).
- ☐ el idioma de una publicación de la solicitud internacional (según la Regla 48.3 (b)).
- ☐ el idioma de la traducción suministrada para el examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).

3. Respecto al nucleótido y/o secuencia amino ácida revelado en la solicitud internacional, se llevó a cabo el examen preliminar internacional según el listado de secuencia:

- ☐ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.
- ☐ registrado junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.
- ☒ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.
- ☒ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.
- ☒ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual el listado de secuencia escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.
- ☒ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual la información presentada en forma legible por computador es idéntica al listado de secuencia escrita.

4. Las modificaciones han resultado en la cancelación de:

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

29

5. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (algunas de) las modificaciones no se hubiesen hecho, ya que se ha considerado que van más allá de la revelación según se presentó (Regla 70.2 (c)).

(Cualquier hoja de remplazo que contenga tales modificaciones debe ser referida bajo el ítem 1 y anexada a este reporte).

6. Observaciones adicionales, si son necesarias:

III. No establecimiento de opinión respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1. Las preguntas como quiera que la invención reivindicada parezca ser novedosa, involucrar un nivel inventivo (para no ser obvio), o para ser aplicable industrialmente no se han examinado en relación con:

- ☐ toda la solicitud internacional,
- ☒ las reivindicaciones Nos. 56, 57, 70 (con respecto a IA) y 1-14, 16, 18, 20-43, 45-48, 51-71 (parcialmente) porque:
- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 56, 57, 70 se relaciona con el siguiente objeto materia el cual no requiere examen preliminar internacional (*especificar*):
ver hoja separada
- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indican elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):
- ☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa.
- ☒ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos. 1-14, 16, 18, 20-43, 45-48, 51-71 (parcialmente)

2. Un examen preliminar internacional significativo no puede llevarse a cabo debido a la falla del nucleótido y/o listado de secuencia amino ácida para cumplir con el estándar preparado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas:

- ☐ el formulario escrito no ha sido proporcionado o no cumple con el Estándar.
- ☐ la forma legible por computador no ha sido proporcionado o no cumple con el Estándar.

V. Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Si:	Reivindicaciones 1-71
	No:	Reivindicaciones
Nivel Inventivo (IS)	Si:	Reivindicaciones 1-71
	No:	Reivindicaciones
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si:	Reivindicaciones 1-55, 58-69, 71
	No:	Reivindicaciones

34

30

2. Citaciones y explicaciones
ver hoja separada

1
32

III. No establecimiento de opinión (Continuación)

Las reivindicaciones 56, 57, 70 identifican la materia-objeto considerada por esta Autoridad a ser cubierto por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT. En consecuencia, no se formulará ninguna opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia-objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4) (a) (I) PCT).

V. Declaración razonada (Continuación)

2.1. CITAS

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: WO 01 09350 A (DALEMANS WILFRIED L. J; SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG (BE); THIRY GEORG) 8 de Febrero de 2001 (2001-02-08) mencionado en la solicitud
- D2: WO OO 71725 A (PIZZA MARIAGRAZIA; RAPPPUOLI RINO (IT); CHIRON SPA (IT); GIULANI M) 30 de Noviembre de 2000 (2000-11-30) mencionado en la solicitud
- D3: WO 99 31132 A (JENNINGS MICHAEL PAUL; PEAK IAN RICHARD ANSELM (AU); UNIV QUEENSLA) 24 de Junio de 1999 (1999-06-24) mencionado en la solicitud

2.2. NOVEDAD (Art. 33(2) PCT)

- 2.2.1. El D1 revela composiciones inmunogénicas que comprenden vesículas de membrana externa derivada de la bacteria negativa gram (*Neisseria meningitidis*, *Morexella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*), en la cual los antígenos protectores están regulados ascendentemente y los antígenos no protectores están regulados descendientemente y la mitad del Lípido A del LPS es detoxificada. La lista de antígenos regulados ascendentemente comprende proteína enlazante de transferrina y del tipo Hsf. (ver resumen, página 12, línea 32- página 13, línea 14; página 14, línea 12-22; página 20, línea 11-22; página 23, línea 21- página 24, línea 7; página 25, línea 11- página 27, línea 22, página 31, línea 1-22; página 31, línea 30- página 32; página 33, línea 12-30; página 36, línea 11-19; ejemplo 8); sin embargo, la combinación específica no se revela y por lo tanto, la materia objeto de las reivindicaciones 1-55 se considera novedosa.
- 2.2.2. La presente solicitud cumple con el criterio establecido en el Artículo 33(2) PCT porque la materia-objeto de las reivindicaciones 1-71 es nueva con respecto al arte anterior mencionado, según lo definido en las regulaciones (Regla 64 (1)-(3) PCT).

2.3. NIVEL INVENTIVO (Art. 33(3) PCT)

- 2.3.1.** Para el análisis del nivel inventivo de las reivindicaciones 1, 48, 55, 56, 58, se considera que el D2 representa el estado de la técnica más relevante y revela composiciones inmunogenicas que comprenden una molécula biológica de *Neisseria* en combinación con la proteína enlazante de transferrina TbpA o TbpB y su uso como una vacuna para tratar o para prevenir infecciones Neisseriales (ver resumen y página 2, línea 12- página 3, línea 2; página 55, línea 1-16). La materia-objeto de las reivindicaciones 1, 48, 55, 56, 58 difiere en cuanto a que la composición inmunogénica comprende proteína del tipo Hsf en combinación con la proteína enlazante de transferrina.
- 2.3.2.** El problema a resolver por la materia objeto de las reivindicaciones 1, 48, 55, 56, 58 puede ser considerado como la provisión de una combinación alternativa con la proteína enlazante de transferrina como composición inmunogénica. La solución sería la combinación de la proteína tipo Hsf y la proteína enlazante de transferrina.
- 2.3.3.** Se considera que esta solución implica un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT). Aunque D2 menciona el uso de proteína enlazante de transferrina en combinación con otras proteínas en una composición de vacunas y D3 describe el uso de Hsf como proteína en una composición de vacunas (ver resumen; reivindicaciones 1-11, 29, 31-33), no se puede encontrar un incentivo o una sugerencia en la técnica anterior que tenga relación con la combinación de proteína enlazante de transferrina y Hsf como proteína, especialmente teniendo en cuenta el efecto sinérgico de la presencia de las dos proteínas en la producción de anticuerpos bactericidas (ver ejemplos).
- 2.3.4.** Una cepa bacteriana construida genéticamente de la reivindicación 60 se considera inventiva porque se puede encontrar un incentivo o una sugerencia en la técnica anterior para realizar dicha cepa bacteriana y porque no sería obvio para una persona versada en la materia realizar esta cepa bacteriana específica.
- 2.3.5.** Los métodos de las reivindicaciones 61-65 para llevar a cabo la novedad e inmunogenicidad inventiva o composiciones de vacunas de las reivindicaciones 1-55 son inventivas. Sin embargo, los procesos los cuales ellos mismos no implicarían un nivel inventivo son patentables en cuanto ellos proveen un producto novedoso e inventivo (Pautas CIV, 9.12).

- 2.3.6. Para el análisis del nivel inventivo de la reivindicación 66-71, se considera que el D3 representa el estado de la técnica más relevante y revela anticuerpos contra la proteína tipo Hsf y su uso para la prevención o tratamiento de la infección *Neisseria* (ver resumen y reivindicaciones 20, 21, 30). La materia-objeto de las reivindicaciones 66-71 difiere en cuanto a que los anticuerpos de la proteína son usados en combinación con los anticuerpos de proteínas enlazantes de transferrina.
- 2.3.7. Por lo tanto, el problema a resolver por la materia objeto de la reivindicación puede ser visto como la provisión de una composición de anticuerpos alternativa. La solución sería una composición que comprenda una combinación de Hsf como anticuerpos de proteínas y anticuerpos de proteínas enlazantes de transferrina.
- 2.3.8. Esta solución se considera que implica un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT), porque no se puede encontrar un incentivo o una sugerencia en la técnica anterior que trate la combinación de anticuerpos de proteínas tipo Hsf y anticuerpos de proteína enlazante de transferrina, teniendo en cuenta el efecto sinérgico no esperado de la presencia de los dos anticuerpos en actividades bacterianas.
- 2.3.9. La presente solicitud, por lo tanto, cumple con el criterio establecido en el Artículo 33(3) PCT y la materia-objeto de las reivindicaciones 1-71 implica un nivel inventivo (Regla 65(1) (2) PCT).

PATENT COOPERATION TREATY

34

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:
Thompson, Clive Beresford
GLAXOSMITHKLINE
Corporate Intellectual Property
CN925.1
980 Great West Road
Brentford
Middlesex TW8 9GS
GRANDE BRETAGNE

**GlaxoSmithKline
Corporate IP
Received BRENTFORD**

28 JUN 2004

ATTY: **CO/PA** ADMIN: **(18)**

PM: **MA** ON: **ON** UPDATED ON: **ON**

ATTY CHECKED/FILE **ON**

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT
(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

25.06.2004

Applicant's or agent's file reference
CLJ/B45314

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP 03/08587

International filing date (day/month/year)
31.07.2003

Priority date (day/month/year)
02.08.2002

Applicant
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



European Patent Office - P.B. 6818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tlx: 31 851 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3018

Authorized Officer

Wallentin, M
Tel. +31 70 340-3991



36

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

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

Applicant's or agent's file reference CLJ/B45314		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/PEA/416)	
International application No. PCT/EP 03/08567	International filing date (day/month/year) 31.07.2003	Priority date (day/month/year) 02.08.2002	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC A61K38/085			
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. et al.			
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of sheets.			
3. This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the opinion 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 Rule 68.2(a)(ii) 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 18.02.2004		Date of completion of this report 25.06.2004	
Name and mailing address of the International preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tlx 31 661 epo nl Fax: +31 70 340 - 3018		Authorized Officer Noë, V Telephone No. +31 70 340-4181 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/EP 03/08567**

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

1-51 as originally filed

Claims, Numbers

1-71 as originally filed

Drawings, Sheets

1/1 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.:
☐ the drawings, sheets:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/EP 03/08567**

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. 56,57,70 (with respect to IA) and 1-14,16,18,20-43,45-48,51-71 (partially)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 56,57,70 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. 1-14,16,18,20-43,45-48,51-71 (partially)

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

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

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

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-71
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-71
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-55,58-69,71
	No: Claims	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/EP 03/08567**

2. Citations and explanations
see separate sheet

III. Non-establishment of opinion (Continuation)

Claims 56,57,70 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).

V. Reasoned statement (Continuation)

2.1 CITATIONS

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 01 09350 A (DALEMANS WILFRIED L J ;SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG (BE); THIRY GEORG) 8 February 2001 (2001-02-08) cited in the application
D2: WO 00 71725 A (PIZZA MARIAGRAZIA ;RAPPUOLI RINO (IT); CHIRON SPA (IT); GIULIANI M) 30 November 2000 (2000-11-30) cited in the application
D3: WO 99 31132 A (JENNINGS MICHAEL PAUL ;PEAK IAN RICHARD ANSELM (AU); UNIV QUEENSLA) 24 June 1999 (1999-06-24) cited in the application

2.2 NOVELTY (Art. 33(2) PCT)

2.2.1 D1 discloses immunogenic compositions comprising outer membrane vesicles derived from gram negative bacteria (*Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*) in which protective antigens are upregulated and non-protective antigens are downregulated and the Lipid A moiety of LPS is detoxified. The list of upregulated antigens comprises Hsf-like and transferrin binding protein. (see abstract, page 12, line 32 - page 13, line 14; page 14, line 12-22; page 20, line 11-22; page 23, line 21 - page 24, line 7; page 25, line 11 - page 27, line 22; page 31, line 1-22; page 31, line 30 - page 32; page 33, line 12-30; page 36, line 11-19; example 8), however, the specific combination is not disclosed and therefore, the subject matter of claims 1-55 is considered to be novel.

2.2.2 The present application does satisfy the criterion set forth in Article 33(2) PCT

because the subject-matter of claims 1-71 is new in respect of the cited prior art as defined in the regulations (Rule 64(1)-(3) PCT).

2.3 INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT)

2.3.1 For inventive step analysis of claim 1,48,55,56,58, D2 is considered to represent the most relevant state of the art and discloses immunogenic compositions comprising a biological molecule from *Neisseria* in combination with transferrin binding protein TbpA or TbpB and their use as a vaccine to treat or to prevent *Neisserial* infections (see abstract and page 2, line 12 - page 3, line 2; page 55, line 1-16). The subject-matter of claims 1,48,55,56,58 differs in that the immunogenic composition comprises Hsf like protein in combination with transferrin binding protein.

2.3.2 The problem to be solved by the subject matter of claims 1,48,55,56,58 may therefore be regarded as the provision of an alternative combination with transferrin binding protein as immunogenic composition. The solution would be the combination of Hsf like protein and transferrin binding protein.

2.3.3 This solution is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT). Although D2 mentions the use of transferrin binding protein in combination with other proteins in a vaccine composition and D3 describes the use of Hsf like protein in a vaccine composition (see abstract; claims 1-11,29,31-33). No incentive or suggestion can be found in the prior art concerning the combination of transferrin binding protein and Hsf like protein, mainly bearing in mind the synergistic effect of the presence of both proteins on the production of bactericidal antibodies (see examples).

2.3.4 A genetically engineered bacterial strain of claim 60 is considered to be inventive because incentive or suggestion can be found in the prior art for making such a bacterial strain and because it would not be obvious for the person skilled in the art to make this specific bacterial strain.

2.3.5 The methods of claims 61-65 for making the novel and inventive immunogenic or vaccine compositions of claims 1-55 are inventive. Processes which themselves would not involve an inventive step are nevertheless patentable insofar they provide a novel and inventive product (Guidelines CIV,9.12).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP 03/08567

41

- 2.3.6 For inventive step analysis of claim 66-71, D3 is considered to represent the most relevant state of the art and discloses antibodies against Hsf like protein and their use for the prevention or treatment of Neisseria infection. (see abstract and claims 20,21,30). The subject-matter of claims 66-71 differs in that the Hsf like protein antibodies are used in combination with transferrin binding protein antibodies.
- 2.3.7 The problem to be solved by the subject matter of claim may therefore be regarded as the provision of an alternative antibody composition. The solution would be a composition comprising a combination of Hsf like protein antibodies and transferrin binding protein antibodies.
- 2.3.8 This solution is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) because no incentive or suggestion can be found in the prior art concerning the combination of Hsf like protein antibodies and transferrin binding protein antibodies also bearing in mind the unexpected synergistic effect of the presence of both antibodies on bactericidal activities.
- 2.3.9 The present application does therefore satisfy the criterion set forth in Article 33(3) PCT and the subject-matter of claims 1-71 does involve an inventive step (Rule 65(1)(2) PCT).

43

42

**COMPOSICION DE VACUNA QUE COMPRENDE PROTEINA
DE ENLACE DE TRANSFERRINA Y HSF DE BACTERIA
GRAM-NEGATIVA**

5 RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones
inmunogénicas y vacunas para la prevención o tratamiento
de infección por bacteria Gram negativa. Las
10 composiciones inmunogénicas de la presente invención,
comprenden proteína de enlace a transferrina y Hsf, y la
combinación de estos dos antígenos ha mostrado actuar en
forma sinérgica para producir anticuerpos con actividad
superior en un ensayo bactericida de suero. Esta
15 combinación de antígenos es útil para utilizarse en vacunas
contra *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*,
Moraxella catarrhalis y *Haemophilus influenzae*.

**C O M P O S I C I O N D E V A C U N A Q U E C O M P R E N D E P R O T E I N A
D E E N L A C E D E T R A N S F E R R I N A Y H S F D E B A C T E R I A
G R A M - N E G A T I V A**

5 Campo del Invento

La presente invención se refiere al campo de las composiciones y vacunas inmunogénicas de bacteria gram-negativa, su fabricación y al uso de dichas composiciones en medicina. Más particularmente, se refiere a
10 composiciones de vacuna que comprenden tanto proteína de enlace de transferrina como Hsf. La presencia de ambos de estos antígenos conduce a la producción de mayores niveles de anticuerpos bactericidas.

Antecedentes del Invento

15 Las bacterias gram-negativas son los agentes que originan un número de patologías humanas, y existe la necesidad de que se desarrollen vacunas efectivas contra muchas de estas bacterias. En particular, *Bordetella pertusis*, *Borrella burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Brucella*
20 *ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Yersinia enterocolitica*, son bacterias gram-negativas que originan
25 patologías que podrían ser tratadas mediante vacunación.

Neisseria gonorrhoeae es el agente etiológico de la gonorrea, una de las enfermedades sexualmente transmitidas reportadas con mayor frecuencia en el mundo, con una incidencia anual de 62 millones de casos (Gerbase
30 y Asociados, 1998 Lancet 351; (Suppl 3) 2-4). Las

manifestaciones clínicas de la gonorrea incluyen inflamación de las membranas mucosas del tracto urogenital, infecciones en garganta o recto y ojos neonatales. Las infecciones de gonococo ascendente en
5 mujeres pueden conducir infertilidad, embarazo ectópico, enfermedad de inflamación pélvica crónica y formación de abscesos tubo-ováricos. La septicemia, artritis, endocarditis y meningitis están asociadas con gonorrea complicada.

10 El gran número de cepas de gonococos con resistencia a antibióticos, contribuye a una morbilidad incrementada y a complicaciones asociadas con gonorrea. Una alternativa atractiva para tratar la gonorrea con anticuerpos, podría ser su prevención utilizando
15 vacunación. Actualmente no existen vacunas para infecciones por *N. gonorrhoeae*.

Neisseria meningitidis es un patógeno importante, particularmente en niños y adultos jóvenes. La septicemia y meningitis son las formas de enfermedad meningococal
20 invasiva (IMD) que ponen en mayor riesgo la vida. Esta enfermedad se ha vuelto un problema de salud a nivel mundial, debido a su alta morbilidad y mortalidad.

Se han identificado trece serogrupos de *N. meningitidis* con base en diferencias antigénicas en los
25 polisacáridos capsulares, siendo los más comunes A, B, y C los cuales son responsables del 90% de la enfermedad a nivel mundial. El serogrupo B es la causa más común de enfermedad meningococal en Europea, EUA y diversos países en Latinoamérica.

30 Las vacunas a base de polisacáridos capsulares de

los serogrupos A, C, W y Y han sido desarrollados y han
mostrado controlar los brotes de la enfermedad
meningococal (Peltola y Asociados, 1985 Pediatrics 76;91-
96). Sin embargo el serogrupo B es inmunogénico en forma
5 deficiente e induce únicamente a una respuesta de
anticuerpos temporal de un isotipo predominantemente IgM
(Ala'Aldeen D y Cartwright K. 1996, J. Infect. 33; 153-157).
Por consiguiente no existe una vacuna totalmente efectiva
actualmente contra el meningococcus de serogrupo B, el
10 cual es responsable de la mayor parte de la enfermedad en
los con climas más templados. Esto es particularmente
problemático, ya que la incidencia de la enfermedad de
serotipo B está incrementando en Europa, Australia y
América, en su mayoría en niños menores a 5 años. El
15 desarrollo de la vacuna contra el meningococcus del
serogrupo B, presenta dificultades particulares debido a
que la cápsula de polisacáridos es inmunogénicamente
deficiente debido a su similitud inmunológica con la
molécula de adhesión de la célula neural humana. Por
20 consiguiente, se han concentrado las estrategias para la
producción de una vacuna en las estructuras expuestas en
la superficie de la membrana externa meningococal,
aunque han sido obstaculizadas por la marcada variación
en estos antígenos entre las cepas.

25 Los desarrollos adicionales han conducido a la
introducción de vacunas elaboradas de vesículas de
membrana externa las cuales contendrán un número de
proteínas que cubren el contenido normal de la membrana
bacteriana. Una de estas es la vacuna VA-MENGOC-BC®
30 Cuban contra *N. meningitidis* de serogrupos B y C

46

(Rodríguez y Asociados, 1999 Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro 94; 433-440). Esta vacuna fue diseñada para combatir un brote de enfermedad de meningococal invasiva en Cuba, la cual no ha sido eliminada a través de un programa de vacunación que utiliza una vacuna de polisacárido capsular AC. Los serogrupos prevaletentes fueron B y C y la vacuna VA-MENGOC-BC® tuvo éxito en el control del brote con una eficiencia de la vacuna estimada en un 83% contra las cepas del serogrupo B de *N. meningitidis* (Sierra y Asociados, 1990 In Neisseria, Walter Gruyter, Berlín, m. Atchman y Asociados (editores) página 129-134, Sierra y Asociados, 1991, NIPH Ann. 14; 195-210). Esta vacuna fue efectiva contra un brote específico, sin embargo, la respuesta inmune provocada podría no proteger contra otras cepas de *N. meningitidis*.

Los estudios de eficacia subsecuentes conducidos en Latinoamérica durante epidemias causadas por cepas meningococales de serogrupo B homólogas y heterólogas, han mostrado alguna eficacia en niños más grandes y adultos, pero su efectividad fue significativamente más baja en niños más pequeños los cuales están en un mayor riesgo de infección (Milagres y Asociados, 1994, Infect. Immun. 62:4419-4424). Es cuestionable qué tan efectiva podría ser dicha vacuna en países con una enfermedad endémica de cepa múltiple tal como el Reino Unido. Los estudios de inmunogenicidad contra cepas heterólogas, han demostrado una actividad bactericida de suero reactivo cruzado únicamente limitada, especialmente en infantes (Tappero y Asociados, 1999, JAMA 281; 1520-1527).

Se desarrolló una segunda vacuna de vesícula de

48

membrana externa en Noruega, utilizando un aislado de serotipo B típico de los prevalecen en Escandinavia (Fredriksen y Asociados, 1991, NIPH Ann, 14; 67-80). Esta vacuna fue probada en pruebas clínicas y se descubrió que
5 tiene una eficacia protectora después de 29 meses en un 57% (Bjune y Asociados, 1991, Lancet, 338; 1093-1096).

Sin embargo, el uso de vesículas de membrana externa en vacunas, está asociado con algunos problemas. Por ejemplo, el OMV contiene lipopolisacáridos tóxicos y
10 pueden contener antígenos inmunodominantes, los cuales son ya sea específicos de una cepa o se expresan en forma variable. Se han descrito diversos procesos los cuales se podrían utilizar para superar algunos de los problemas de las vacunas con preparación de vesícula de membrana
15 externa. El documento WO01/09350 describe procesos que atienden algunos de estos problemas, por ejemplo, reduciendo la toxicidad y modificando los antígenos que se encuentran en las vesículas de membrana externa.

Existen diversos problemas con las vacunas anti-
20 meningococales actualmente disponibles. Las vacunas de membrana externa a base de proteína tienden a ser específicas y efectivas únicamente contra algunas cepas. Las vacunas de polisacáridos tampoco son muy óptimas, ya que tienden a generar respuestas inmunes deficientes y
25 cortas, particularmente contra el serogrupo B (Lepow y Asociados, 1986; Peltola 1998, Pediatrics 76; 91-96).

Las infecciones por *Neisseria* representan un problema de salud considerable para el cual no existen vacunas en el caso de *N. gonorrhoeae* o están disponibles
30 vacunas con limitaciones en cuanto a su eficacia y

capacidad de proteger contra cepas heterólogas en el caso de *N. gonorrhoeae*. Claramente existe la necesidad de desarrollar vacunas superiores contra infecciones por *Neisseria* que serán mejoradas en cuanto a la eficacia de las vacunas actualmente disponibles, y permitirán la protección contra un mayor rango de cepas.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1. - Un gel teñido con Coomassie que muestra niveles de expresión de Hsf, TbpA y Nsp A en preparaciones de vesícula de membrana externa derivados de diferentes cepas de *N. meningitidis*. Columna 1 - marcadores de peso molecular; columna 2 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en la cual se desactivaron los polisacáridos capsulares; columna 3 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en donde se desactivaron los polisacáridos capsulares y PorA; columna 4 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en donde los polisacáridos capsulares y PorA fueron desactivados y se activó NspA; columna 5 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en donde se desactivaron los polisacáridos capsulares y PorA, y se activó Hsf; columna 6 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en donde se desactivaron los polisacáridos capsulares y PorA y se activó TbpA; columna 7 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en donde se desactivaron los polisacáridos capsulares y PorA y se activaron TbpA y Hsf; columna 8 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en donde se

desactivaron los polisacáridos capsulares y PorA y se activaron TbpA y NspA.

Descripción Detallada del Invento

La presente invención describe una combinación de
5 antígenos que cuando se combinan en una composición o
vacuna inmunogénica, pueden inducir a tituladores de
anticuerpos bactericidas superiores a los que se inducen
mediante antígenos cuando se administran por separado.
Preferentemente, la combinación de antígenos conduce a
10 tituladores de anticuerpos bactericidas sinérgicamente
superiores. Ya que los anticuerpos bactericidas reflejan de
manera más precisa la eficacia de los candidatos a
vacunas, la combinación de Tbp y Hsf en vacunas producirá
vacunas altamente efectivas. Una ventaja adicional de la
15 presente invención, será que la combinación de dos
antígenos, Tbp y Hsf, también permitirá la protección
contra un mayor rango de cepas.

La presente invención se refiere a una composición
inmunogénica que comprende proteína de enlace de
20 transferrina y proteína similar a Hsf o fragmentos
antigénicos de la misma. Estas proteínas son ya sea
aisladas o preferentemente purificadas hasta al menos el
30%, 40%, más preferentemente 50%, 60%, 70%, 80%,
90%, 95%, ó 99% de pureza o enriquecidas en una mezcla
25 con otros antígenos. La proteína de enlace de transferrina
y la proteína similar a Hsf, pueden aislarse o derivarse a
partir de las mismas cepas de bacteria gram-negativa o de
cepas diferentes.

El término "aislado", significa aislado por el hombre
30 del ambiente natural de la proteína. El término "purificado",

50

significa purificado hasta al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ó 99% de pureza antes de que el antígeno se combine con otros componentes de la composición inmunogénica de la presente invención.

5 El término "derivado de", significa que el gen que codifica la proteína es derivado de, o la proteína es purificada de, una cepa bacteriana en particular. Por consiguiente, el término "derivado de", incluye proteínas recombinantes producidas en un sistema de expresión por separado si el gen que codifica la proteína fue derivado de
10 la bacteria denominada.

Cuando se combinan, Tbp y Hsf han mostrado interactuar de manera conveniente y preferentemente en forma sinérgica para provocar una respuesta inmune que
15 sea mayor en términos de actividad bactericida (por ejemplo, tal como se mide mediante ensayo bactericida de suero o SBA) y preferentemente mayor que la respuesta aditiva provocada por los antígenos en forma individual, más preferentemente por un factor de al menos 1.1, 1.2,
20 1.5, 2, 3, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, más preferentemente por un factor de al menos 10. La adición tanto de Tbp como de Hsf a una vacuna, tendrá ventajas considerables con respecto a las vacunas normalmente disponibles en la generación de una respuesta inmune bactericida fuerte y permitiendo la
25 protección contra cepas múltiples.

Una modalidad de la presente invención es una composición inmunogénica que comprende tanto proteínas de enlace de transferrina como proteínas similares a Hsf. Una composición inmunogénica es una composición que
30 comprende al menos un antígeno el cual tiene la capacidad

52

51

de generar una respuesta inmune cuando se administra a un huésped. La proteína similar a Tbp y Hsf, puede derivarse de cualquier cepa de bacterias gram-negativas que incluyen *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella*, *Neisseria* (Incluyendo *Neisseria meningitidis* que podría ser del serogrupo A, B, C, W135 ó Y y *Neisseria gonorrhoeae*) o cualesquiera de las bacterias gram-negativa descritas anteriormente. La presente invención cubre composiciones inmunogénicas en las cuales la proteína similar a Tbp y Hsf, se deriva ya sea de la misma o diferentes cepas de la bacteria gram-negativa.

Proteínas de enlace de transferrina

La proteína de enlace de transferrina (Tbp) es una proteína o complejo de proteína en la membrana externa de la bacteria gram-negativa, que enlaza a transferrina. Algunas proteínas en esta familia formarán un beta-barril anclado en la membrana externa. Estructuralmente, la proteína que enlaza a transferrina puede contener un dominio de terminal-N intracelular con un cuadro TonB y un dominio de tapón, múltiples hebras de transmembrana beta enlazadas mediante lazos intracelulares cortos y lazos extracelulares más largos. Otros ejemplos son lipoproteínas que interactúan para formar un complejo con la proteína de membrana integral. Los ejemplos de esta familia de proteínas, son TbpA y TbpB. El término "Tbp", comprende cualesquiera de estas proteínas en forma individual o en combinación, y un complejo formado de TbpA y TbpB. Preferentemente, al menos TbpA está presente en las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

JS

52

Se han distinguido dos familias de TbpB, que tienen un peso molecular alto y un peso molecular bajo, respectivamente. Las formas de peso molecular alto y bajo de TbpB (WO93/06861; EP586266) se asocian con diferentes familias de TbpA (WO93/06861; EP586266, WO92/03467; US5912336), las cuales son distinguibles en las bases de homología. A pesar de ser del mismo peso molecular, las familias de TbpA son conocidas como familias con peso molecular alto y familias con peso molecular bajo debido a su asociación con la forma de TbpB de peso molecular alto o bajo (Rokbi y Asociados, FEMS Microbiol. Lett. 100; 51, 1993). TbpA y TbpB son conocidas por ser expresadas en una variedad de bacterias, incluyendo *N. meningitidis* (WO93/06861; EP586266; WO92/03467; US5912336), *N. gonorrhoeae* (WO92/03467; US5912336), *H. Influenzae* (Gray-Owen y Asociados, Infect. Immun. 1995; 63:1201-1210, Schryvers J. Med. Microbiol. 1989; 29:121-130; WO95/13370; WO96/40929), *A. pleuropneumoniae*, *M. catarrhalis* (Mathers y Asociados, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1997; 19:231; Chen y Asociados, Vaccine 1999; 18:109; WO97/13785; WO99/52947) y *P. haemolytica* (Cornelissen y Asociados, Infection and Immunity 68; 4725, 2000). TbpA y TbpB también han sido referidas como Tbp1 (NMB 0461) y Tbp2 (NMB 0460) respectivamente (Cornelissen y Asociados, Infection and Immunity 65:822, 1997).

Tal como se utiliza en la presente invención, TbpB denota la proteína de enlace a transferrina procedente de bacteria gram-negativa, incluyendo *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae*, preferentemente Neisseria, más

A

preferentemente *N. meningitidis* ó *N. gonorrhoeae* y lo más preferentemente *N. meningitidis* de serotipo B. Tbp comprende tanto TbpA como TbpB y las formas de TbpA y TbpB con peso molecular alto y con peso molecular bajo.

5 Tbp comprende las proteínas individuales descritas anteriormente y los complejos de las proteínas y cualesquiera otras proteínas o complejos de los mismos con la capacidad de enlazar a transferrina.

Aunque Tbp puede referir ya sea formas de TbpA ó
10 TbpB de peso molecular alto o bajo, se prefiere que tanto las formas de TbpA y/o TbpB de peso molecular alto como de peso molecular bajo estén presentes en las composiciones inmunogénicas de la presente invención. Más preferentemente, se encuentra TbpA de peso
15 molecular alto y peso molecular bajo.

También se considera que en lugar de, o además de, Tbps, se puedan incluir otras proteínas de adquisición de hierro en las composiciones inmunogénicas de la presente invención. Las proteínas de adquisición de hierro de
20 *Moraxella catarrhalis* incluyen TbpA, TbpB, receptor dependiente de Ton-B, CopB (Sethi y Asociados, Infect. Immun. 1997; 65:3666-3671), HasR, OmpB1 y LpbB (Du y Asociados, Infect. Immun. 1998; 66:3656-3665; Mathers y Asociados, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1997; 19: 231-
25 236; Chen y Asociados, Vaccine 1999; 18:109-118). Las proteínas de adquisición de hierro de *Haemophilus influenzae* incluyen TbpB, HasR, receptor dependiente de TonB, proteína de enlace a hemoglobina, HhuA, HgpA, HgbA, HgbB y HgbC (Cope y Asociados, Infect. Immun.
30 2000; 68:4092-4101; Maciver y Asociados, Infect. Immun.

54

1996; 64:3703-3712, Jin y Asociados, Infect. Immun. 1996; 64:3134-3141; Morton y Asociados, J. Gen. Microbiol. 1990; 136:927-933; Schryvers J. Med. Microbiol. 1989; 29:121-130). Las proteínas de adquisición de hierro procedentes de *Neisseria meningitidis* incluyen Tbp1 (NMB 0461), Tbp2 (NMB 0460), FbpA (NMB 0634), FbpB, BfrA (NMB 1207), BfrB (NMB 1206), LbpA (NMB 1540), LbpB (NMB 1541), Lipo28 también conocida como GNA2132 (NMB 2132), Sibp (NMB 1882), receptores dependientes de Ton B (NMB 0934 y NMB 0293) y HmbR (Tettelin y Asociados, Science 287; 18091815, 2000).

Las proteínas Tbp incluidas en las composiciones inmunogénicas de la presente invención, son proteínas que comparten homología con TbpA y TbpB de *N. meningitidis*, tal como se describe en los documentos WO93/06861 y EP586266; y preferentemente comparten aproximadamente el 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, más preferentemente alrededor de 80% ó 90%, lo más preferentemente alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de TbpA y TbpB, tal como se describe en los documentos WO93/06861 y EP586266.

Tbp contiene diversas regiones distintas. Por ejemplo, en el caso de TbpA procedente de la cepa *N. meningitidis* H44/76, los 186 aminoácidos de terminal amino forman un dominio globular interno, 22 hebras beta abarcan la membrana, formando una estructura de barril beta. Estas se enlazan mediante lazos intracelulares cortos y lazos extracelulares más largos. Los lazos extracelulares 2, 3, y 5 tienen el mayor grado de variabilidad de secuencia y el lazo 5 está expuesto a la superficie. Los lazos 5 y 4 están

86

53

implicados en el enlace de ligante, y son fragmentos TbpA preferidos para la inclusión en las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

Además de las técnicas de activación genética aquí
5 descritas, las proteínas de enlace de transferrina también pueden ser activadas en bacterias gram-negativas, cuando crecen bajo condiciones de limitación de hierro, tal como se describe más adelante. En composiciones inmunogénicas de la presente invención, en donde se
10 activa la proteína de enlace a transferrina en una vesícula de membrana externa, la activación se logra preferentemente mediante el crecimiento de la cepa huésped bajo condiciones de limitación de hierro. Este proceso también dará como resultado la activación de
15 proteínas reguladas por hierro variables, particularmente FrpB en cepas *Neisseria* y la proteína de utilización heme/hemopexina C, HgpA y HgpB en *Haemophilus influenzae*, el cual se puede volver inmunodominante. Por consiguiente es conveniente desactivar la expresión de (y
20 preferentemente eliminar los genes de codificación) las proteínas que se describirán más adelante, para asegurar que la composición inmunogénica de la presente invención provoca una respuesta inmune contra antígenos que se encuentran en un amplio rango de cepas.

25 Proteína similar a Hsf. Las proteínas similares a Hsf son proteínas autotransportadoras que comparten homología con Hsf de *N. meningitidis* con las secuencias encontradas en el documento WO99/31132; que comparten preferentemente alrededor del 40%, 50%, 60%, 70%, más
30 preferentemente alrededor del 80%, lo más

54

preferentemente alrededor del 90%, lo más preferentemente alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos Hsf encontrada en el documento WO99/31132 (preferentemente la SEQ ID NO:2, 4, 6, u 8). Las proteínas similares a Hsf son proteínas expuestas en la superficie y se considera que funcionan como adhesinas. Estas proteínas forman un complejo multimérico y se expresan durante la infección y colonización.

Las proteínas similares a Hsf se encuentran en muchas bacterias gram-negativo incluyendo *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, y *Escherichia coli*. Los ejemplos de proteínas similares a Hsf encontradas en *Neisseria meningitidis* incluyen Hsf (también conocido como NhhA - NMB 0992) (WO99/31132), proteína similar a Alda-1 (Peak y Asociados, 2000, FEMS Imm. Med. Microbiol. 28; 329), proteasa IgA, Ssh-2, Hap (WO99/55873), NadA (J. Exp. Med. 2002, 195; 1445), UspA2 y Tsh. Los ejemplos de proteínas similares a Hsf en *Moraxella catarrhalis* incluyen Hsf, UspA1 (WO93/03761), UspA2 (WO93/03761), esterasa de membrana externa y YtfN. Los ejemplos de proteínas similares a Hsf en *Haemophilus influenzae* incluyen Hia/Hsf (St. Geme y Asociados, J. Bacteriol. 2000 182:6005-6013), Hap, proteasa IgA1, HMW1, HMW2 (Barenkamp y Asociados, Infect. Immun. 1992 60; 1302-1313), YadA, YadAc y YtfN (Hendrixson y Asociados, Mol. Cell 1998; 2:941-850; St. Geme y Asociados, Mol. Microbiol. 1994; 14:217-233; Grass y St. Geme Infect. Immunol. 2001; 69; 307-314; St. Geme y

57

Cutter J. Bacteriology 2000; 182; 6005-6013). Los ejemplos de proteína similares a Hsf en *Escherichia coli* incluyen Hsf, Hia, y Hap.

Hsf tiene una estructura que es común para proteínas autotransportadoras. Por ejemplo, Hsf procedente de la cepa de *N. meningitidis* H44/76, consiste de una región principal en el término amino de la proteína (aminoácidos 52 a 479) que está expuesta en la superficie y contiene regiones variables (aminoácidos 52 a 106, 121 a 124, 191 a 210 y 230 a 234), una región del cuello (aminoácidos 480 a 509), una región de alfa-hélice hidrofóbica (aminoácidos 518 a 529) y un dominio de ancla en el cual cuatro hebras de transmembrana abarcan la membrana externa (aminoácidos 539 a 591).

Hsf se puede referir al polipéptido de longitud total incluyendo la secuencia de señal que consiste de los aminoácidos 1 a 51. La presente invención también comprende Hsf con la secuencia de señal eliminada, de modo que el polipéptido puede consistir de la forma madura de Hsf. Se pueden truncar otras formas preferidas de Hsf para eliminar regiones variables de la proteína descrita en el documento WO01/55182. Las variantes preferidas podrían incluir la eliminación de 1, 2, 3, 4, ó 5 regiones variables tal como se define en el documento WO01/55182. Las variantes preferidas podrían eliminar residuos de entre la secuencia de aminoácidos del 52 al 237 o podrían eliminar los aminoácidos del 54 al 237, más preferentemente eliminando residuos entre el aminoácido 52 al 173 o los aminoácidos 55 al 133. Quedará entendido que las variantes truncadas pueden incluir o excluir la

39

50

secuencia de señal de los aminoácidos 1 a 51 de Hsf. La
secuencia anterior y las descritas a continuación, pueden
truncarse o ampliarse mediante 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, ó 15
aminoácidos ya sea en ambos o cualesquiera de los
5 términos N y C.

Cuando se utiliza Hsf en una vacuna de subunidad, se
prefiere que se utilice una parte del dominio pasajero
soluble; por ejemplo el dominio completo de los
aminoácidos 52 a 479, más preferentemente una parte
10 conservada de la misma, por ejemplo, los aminoácidos 134
a 479.

Aunque la proteína similar a Tbp y/o Hsf de longitud
total (en particular TbpA y Hsf) se utiliza preferentemente,
o variantes naturales de la misma, o secuencias de
15 longitud total que carecen de no más de 60 aminoácidos de
los términos N y/o C, también se incluyen fragmentos
antigénicos de proteínas similares a Tbp y/o Hsf en la
composición inmunogénica de la presente invención. Estos
fragmentos que contienen al menos 10 aminoácidos,
20 preferentemente 20 aminoácidos, más preferentemente 30
aminoácidos, más preferentemente 40 aminoácidos o lo
más preferentemente 50 aminoácidos, tomados en forma
contigua a partir de la secuencia de aminoácidos de la
proteína similar a Tbp y Hsf, preferentemente TbpA y Hsf.
25 Además, los fragmentos antigénicos denotan fragmentos
que son inmunológicamente activos con anticuerpos
generados contra la proteína similar a Tbp ó Hsf *N. meningitidis*,
preferentemente TbpA ó Hsf o con anticuerpos
generados mediante la infección de un
30 huésped mamífero con *N. meningitidis*. Los fragmentos

60

antigénicos también incluyen fragmentos que provocan una respuesta inmune que es específica contra la proteína similar a Tbp ó Hsf, preferentemente TbpA ó Hsf de la bacteria gram-negativa de la cual se derivan.

5 Preferentemente, protege contra infección procedente de la bacteria de la cual se deriva, preferentemente infección por *Neisseria*, más preferentemente protege contra infección por *N. meningitidis*, más preferentemente, protege contra infección por *N. meningitidis* de serogrupo B.

10 Los fragmentos preferidos de TbpA incluyen los lazos extracelulares de TbpA. Utilizando la secuencia de TbpA procedente de la cepa *N. meningitidis* H44/76, estos lazos corresponden a los aminoácidos 200 a 202 del lazo 1, los aminoácidos 226 a 303 del lazo 2, los aminoácidos 348 a
15 395 del lazo 3, los aminoácidos 438 a 471 del lazo 4, los aminoácidos 512 a 576 del lazo 5, los aminoácidos 609 a 625 del lazo 6, los aminoácidos 661 a 671 del lazo 7, los aminoácidos 707 a 723 del lazo 8, los aminoácidos 769 a 790 del lazo 9, los aminoácidos 814 a 844 del lazo 10, y
20 los aminoácidos 872 a 903 del lazo 11. Las secuencias correspondientes, después de la alineación de las secuencias, en otras proteínas Tbp podrían constituir fragmentos preferidos. Los fragmentos más preferidos pueden incluir secuencias de aminoácidos que comprenden
25 el lazo 2, el lazo 3, el lazo 4, ó el lazo 5 de Tbp.

Aunque los fragmentos preferidos de las proteínas Tbp ó TbpA descritas anteriormente se refieren a *N. meningitidis*, un experto en la técnica puede tener la capacidad de encontrar fácilmente los péptidos
30 equivalentes en las proteínas Tbp ó TbpA de todas las

61

cepas gram-negativa anteriores sobre una base de homología de secuencia, los cuales también son fragmentos de la presente invención.

Los fragmentos preferidos de Hsf incluyen toda la
5 región principal de Hsf, conteniendo preferentemente los aminoácidos 52 a 472 de Hsf. Los fragmentos preferidos adicionales de Hsf incluyen regiones expuestas en la superficie de la región principal incluyendo los aminoácidos 52 a 62, 76 a 93, 116 a 134, 147 a 157, 157 a 175, 199 a
10 211, 230 a 252, 252 a 270, 284 a 306, 328 a 338, 362 a 391, 408 a 418, 430 a 440 y 469 a 479. Los fragmentos más preferidos son 139 a 591 para utilizarse en una preparación OMV de la presente invención y 134 a 479 para utilizarse en una composición de subunidad de la presente
15 invención.

Aunque los fragmentos preferidos de las proteínas Hsf ó similares a Hsf descritas anteriormente se refieren a *N. meningitidis*, un experto en la técnica podrá tener la facilidad de encontrar fácilmente los péptidos equivalentes
20 en las proteínas Hsf ó similares a Hsf de todas las cepas gram-negativa anteriores en una base de homología de secuencia, los cuales también son fragmentos de la presente invención.

También incluidas en la presente invención, están las
25 proteínas de fusión de la proteína similar a Tbp y Hsf, preferentemente TbpA y Hsf. Estas pueden combinar la proteína tanto Tbp como similar a Hsf, preferentemente TbpA y Hsf, o fragmentos de los mismos en el mismo polipéptido. Como alternativa, la presente invención
30 también incluye proteínas de fusión individual de Tbp y

proteína similar a Hsf, preferentemente TbpA y/o Hsf, o fragmentos de los mismos, siempre que tanto Tbp como la proteína similar a Hsf, preferentemente TbpA y Hsf, o fragmentos de las mismas, se encuentren en la
5 composición de la presente invención. TbpA y Hsf podrían formar por ejemplo una proteína de fusión con β -galactosidasa, glutatona-S-transferasa, proteínas fluorescentes verdes (GFP), etiquetas de epítopos tales como FLAG, etiqueta-myc, polihistidina o proteínas de
10 superficie virales/bacterianas tales como haemaglutinina de virus influenza, toxoide de tétano, toxoide de difteria ó CRM197.

Las proteínas de enlace a transferrina aisladas que podrían introducirse en una composición inmunogénica, son
15 bien conocidas en la técnica (WO0025811). Se pueden expresar en un huésped bacteriano, extraerse utilizando detergente (por ejemplo, Elugent al 2%) y purificarse mediante cromatografía por afinidad o utilizando técnicas de cromatografía de columna estándar bien conocidas en el
20 arte (Oakhill y Asociados, Biochem. J. 2002, 364; 613-6). En forma similar, el aislamiento de Hsf se puede lograr utilizando técnicas conocidas en el arte. Hsf recombinante puede expresarse en *E. coli* u otras cepas bacterianas. La proteína puede ser purificada utilizando cromatografía por
25 afinidad. Esto puede ser un procedimiento de rutina si se introdujera una secuencia en la etiqueta Hsf.

Los términos "que comprende", "comprende" y "comprenden" de la presente invención, están proyectados para ser opcionalmente sustituibles con los términos "que
30 consiste de", "consiste de", respectivamente, en cada caso.

65

Combinaciones de Vacunas

La presente invención se refiere a combinaciones de antígenos incluyendo Tbp y proteína similar a Hsf, las cuales son efectivas para provocar una actividad bactericida superior contra la bacteria gram-negativa. Las composiciones antigénicas de la presente invención pueden comprender antígenos además de Tbp y Hsf. Pueden comprender otros antígenos de proteína procedentes de la bacteria gram-negativa, preferentemente *Neisseria* y más preferentemente de *N. meningitidis*.

N. meningitidis

Para *N. meningitidis*, las composiciones inmunogénicas de la presente invención comprenden preferentemente Hsf y TbpA. En una preparación OMV, se prefiere que Hsf y TbpA sean activadas en la cepa *N. meningitidis* de la cual se deriva el OMV. TbpA puede presentarse en una forma de peso molecular tanto alto como bajo y preferentemente se representan formas de peso molecular tanto alto como bajo. Hsf está presente preferentemente en OMVs como un truncado integrado por la membrana, preferentemente los aminoácidos 134 a 591. Hsf también puede estar presente como una vacuna de subunidad, preferentemente como un dominio pasajero (aminoácido 52 a 479), lo más preferentemente como un truncado de dominio pasajero de los aminoácidos 134 a 479.

Se pueden agregar antígenos adicionales a las composiciones anteriores (o activarse si se presentan en un OMV), por ejemplo, NspA (WO96/29412), Hap (PCT/EP99/02766), PorA, PorB, OMP85 (también conocido

como D15), PilQ (PCT/EP99/03603), PldA (PCT/EP99/06718), FrpB (WO96/31618 ver la SEQ ID NO:38), FrpA (NMB 0585) ó FrpC ó una parte conservada en común para ambos de al menos 30, 50, 100, 500, 750
 5 aminoácidos (WO92/01460), LbpA y/o LbpB (PCT/EP98/05117; Schryvers y Asociados, Med. Microbiol. 1999, 32:1117), FhaB (WO98/02547 SEQ ID NO:38 [nucleótidos 3083-9025]), HasR (PCR/EP99/05989), lipo02 (PCT/EP99/08315), MltA (WO99/57280) (NMB0033) y ctrA
 10 (PCT/EP00/00135).

Las combinaciones de antígenos preferidas en una composición inmunogénica de la presente invención, incluyen combinaciones que comprenden Tbp y la proteína similar a Hsf y FhaB; Tbp y la proteína similar a Hsf y PilQ;
 15 Tbp y la proteína similar a Hsf y NspA; Tbp y la proteína similar a Hsf y FrpC; comprendiendo más preferentemente Tbp y la proteína similar a Hsf y Hap; Tbp y la proteína similar a Hsf y FrpA/C; Tbp y la proteína similar a Hsf y LbpB; Tbp y la proteína similar a Hsf y D15. Más
 20 preferentemente, D15 podría incorporarse como parte de una preparación de vesícula de membrana externa.

Antígenos *Moraxella catarrhalis*

Se prefieren una o más de las siguientes proteínas procedentes de *Moraxella catarrhalis* para la incorporación
 25 en una composición inmunogénica de la presente invención (preferentemente en donde TbpA y las proteínas similares a Hsf se derivan de *Moraxella catarrhalis*): OMP106 (WO 97/41731 y WO 96/34960), HasR (PCT/EP99/03824), PilQ (PCT/EP99/03823), OMP85 (PCT/EP00/01468), lipo06 (GB 9917977.2), lipo10 (GB 9918208.1), lipo11 (GB 9918302.2),
 30

lipo18 (GB 9918038.2), P6 (PCT/EP99/03038), ompCD, CopB (Helminen ME y Asociados (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010), D15 (PCT/EP99/03822), OmpIA1 (PCT/EP99/06781), Hly3 (PCT/EP99/03257), LbpA y LbpB
 5 (WO 98/55606), TbpA y TbpB (WO 97/13785 y WO 97/32980), OmpE, UspA1, y UspA2 (WO 93/03761), y Omp21.

Antígenos *Haemophilus influenzae*

Se prefiere una o más de las siguientes proteínas
 10 procedentes de *Haemophilus influenzae* para la inclusión en una composición inmunogénica de la presente invención (preferentemente en donde TbpA y las proteínas similares a Hsf se derivan de *Haemophilus influenzae*): D15 (WO 94/12641), P6 (EP 281673), TbpA, TbpB, P2, P5 (WO
 15 94/26304), OMP28 (WO 97/01638), HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, Hla, Hsf, Hap, Hin47, y Hif.

Un aspecto adicional de la presente invención son combinaciones de vacunas que comprenden la composición antigénica de la presente invención, con otros antígenos
 20 los cuales se utilizan de manera conveniente contra ciertos estados de enfermedad que incluyen aquellos asociados con enfermedades virales o bacteria gram-positiva.

En una combinación preferida, las composiciones antigénicas que comprenden Tbp y proteína similar a Hsf
 25 de la presente invención, se formulan con 1, 2, 3, ó preferentemente los 4 de los polisacáridos u oligosacáridos capsulares meningococales que se encuentran a continuación, los cuales pueden ser planos o conjugados para un transportador de proteína: A, C, Y ó W-135. Dicha
 30 vacuna que contiene TbpA y Hsf de *N. meningitidis*, puede

utilizarse de manera conveniente como una vacuna de meningococcus global. Se incluyen polisacáridos capsulares meningococales conjugados preferentemente, C, C y Y ó A y C.

5 En una modalidad preferida adicional, las composiciones antigénicas que comprenden TbpA y Hsf de la presente invención, formuladas preferentemente con 1, 2, 3, ó los 4 de los polisacáridos (u oligosacáridos) capsulares meningococales planos o conjugados A, C, Y ó
10 W-135 descritos anteriormente, se formulan con un polisacárido u oligosacárido capsular de *H. Influenzae* b conjugado, y/o uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares neumococales conjugados o planos. Opcionalmente, la vacuna también puede comprender uno o
15 más antígenos de proteínas que pueden proteger un huésped contra infección por *Streptococcus pneumoniae*. Dicha vacuna puede utilizarse de manera conveniente como una vacuna de neumonía meningitis/estreptococcus.

 En una modalidad aún preferida, la composición
20 inmunogénica que comprende Tbp y la proteína similar a Hsf de la presente invención, se formula con polisacáridos capsulares derivados de una o más de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus Influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, Grupo A Streptococci, Grupo B Streptococci,
25 *Staphilococcus aureus* y *Staphilococcus epidermidis*. En una modalidad preferida, la composición inmunogénica puede comprender polisacáridos capsulares derivados de uno o más grupos A, C, W-135 y Y de *Neisseria meningitidis*. Una modalidad preferida adicional podría
30 comprender polisacáridos capsulares derivados de

Streptococcus pneumoniae. Los antígenos de polisacáridos capsulares neumococales son seleccionados preferentemente de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (más preferentemente de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). Una modalidad preferida adicional podría contener los polisacáridos capsulares PRP de *Haemophilus influenzae*. Una modalidad preferida adicional podría contener los 336 polisacáridos funcionales, tipo 5 ó tipo 8 de *Staphylococcus aureus*. Una modalidad preferida adicional podría contener los polisacáridos capsulares Tipo I, Tipo II, ó Tipo III de *Staphylococcus epidermis*. Una modalidad preferida adicional podría contener los polisacáridos funcionales Tipo 1a, Tipo 1c, Tipo II ó Tipo III de estreptococcus Grupo B. Una modalidad preferida adicional podría contener los polisacáridos funcionales de estreptococcus Grupo A, que comprenden preferentemente además al menos una proteína M y más preferentemente múltiples tipos de proteína M. .

Los antígenos de proteínas neumococal preferidos, son aquellas proteínas neumococales que están expuestas en la superficie externa del neumococcus (con la capacidad de ser reconocidos por un sistema inmune del huésped durante al menos parte del ciclo de vida del neumococcus, o son proteínas que son segregadas o liberadas mediante neumococcus. Más preferentemente, la proteína es una toxina, adhesina, transductor de señal de dos componentes o lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae*, o fragmentos de los mismos. Las proteínas particularmente preferidas,

Incluyen pero no se limitan a: neumolisina (destoxificada preferentemente mediante tratamiento o mutación química) [Mitchell y Asociados, Nucleic Acids Res. 1990 julio 11; 18(13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2", 5 Mitchell y Asociados, Biochim Biophys Acta 1989 Enero 23; 1007(1): 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties", WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 10 (Paton y Asociados), WO 99/03884 (NAVA)]; PspA y variantes de eliminación de transmembrana del mismo (Patente Norteamericana 5804193 - Briles y Asociados); PspC y variantes de eliminación de transmembrana de los mismos (WO 97/09994 - Briles y Asociados); PsaA y 15 variantes de eliminación de transmembrana de los mismos (Berry & Paton, Infect. Immun. 1996 Diciembre; 64(12):5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*"); proteínas de enlace a colina neumococal y variantes de eliminación de transmembrana 20 de las mismas; CbpA y variantes de eliminación de transmembrana de la misma (WO 97/41151; WO 99/51266); gliceraldehído-3-fosfato - deshidrogenasa (Infect. Immun. 1996 64:3544); HSP70 (WO 96/40928); PcpA (Sanchez-Beato y Asociados, *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164:207-14); 25 proteína similar a M (EP 0837130) y adhesina 18627, (EP 0834568). Los antígenos de proteína neumococal preferidos son los que se describe en el documento WO 98/18931, particularmente aquellos seleccionados en el 30 documento WO 98/18930 y PCT/US99/30390.

La vacuna también puede comprender opcionalmente antígenos que proporcionan protección contra una o más infecciones por Diphtheria, tétanos y *Bordetella pertussis*. El componente pertussis puede ser *B. pertussis* de célula completa exterminado (Pw) o pertusis acelular (Pa) que
5 comprende al menos un antígeno (y preferentemente los tres) de PT, FHA, y pertactina de 69 kDa. Normalmente, los antígenos que proporcionan protección contra Diphtheria y tétanos podrían ser toxoide de Diphtheria y toxoide de
10 tétanos. Los toxoides pueden ser toxinas desactivadas en forma química o toxinas desactivadas mediante la introducción de mutaciones de punto.

La vacuna también puede comprender opcionalmente uno o más antígenos que pueden proteger a un huésped
15 contra *Haemophilus Influenzae* sin poderse tipificar, RSV y/o uno o más antígenos que pueden proteger a un huésped contra el virus de influenza. Dicha vacuna puede utilizarse de manera conveniente como una vacuna de otitis global.

Los antígenos de proteína de *H. Influenzae* que no se
20 pueden tipificar preferidos, incluyen proteína de Fimbrina (Patente Norteamericana 5766608) y fisiones que comprenden péptidos de los mismos (eg LBI Fusión) (Patente Norteamericana 5843464 - Ohio State Research Foundation), OMP26, P6, proteína D, TbpA, TbpB, Hla,
25 Hmw1, Hmw2, Hap, y D15.

Los antígenos de virus de influenza preferidos incluyen virus completos, vivos o desactivados, virus de influenza dividido, residuos en huevos o células MDCK, o células Vero o virosomas flu completos (tal como lo
30 describe R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o

purificados o proteínas recombinantes de los mismos, tales como proteínas HA, NP, NA, ó M, o combinaciones de las mismas.

Los antígenos RSV preferidos (Virus Sincicial Respiratorio) incluyen glucoproteína F, la glucoproteína G, proteína HN, proteína M o derivados de las mismas.

Se debe apreciar que las composiciones antigénicas de la presente invención pueden comprender uno o más polisacáridos capsulares procedentes de una sola especie de bacteria.

Las composiciones antigénicas también pueden comprender polisacáridos derivados de una o más especies de bacterias.

Dichos polisacáridos capsulares pueden ser no conjugados o conjugados a una proteína transportadora tal como toxoide de tétanos, fragmento toxoide C de tétanos, toxoide de difteria, CRM197, neumolisina, proteína (US6342224), TbpA ó Hsf. Una modalidad de la presente invención podría contener polisacáridos capsulares separados conjugados a TbpA y Hsf.

El conjugado de polisacárido puede prepararse a través de cualquier técnica de acoplamiento conocida. Por ejemplo, el polisacárido puede ser acoplado a través de enlace de tioéter. Este método de conjugación depende de la activación del polisacárido con tetrafluoroborato de piridinio de 1-ciano-4-dimetilamino (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado puede ser acoplado de esta forma directamente o a través de un grupo 2 a un grupo amino en la proteína transportadora. Preferentemente, el éster de cianato se acopla con diamina

71

de hexanos y el polisacárido derivado mediante amino se
conjugado a la proteína transportadora utilizando química de
heteroligación que comprende la formación del enlace de
éster. Este conjugado se describe en la Solicitud PCT
5 publicada WO93/15760 de la Uniformed Services
University.

Los conjugados también pueden ser preparados
mediante métodos de aminación reductiva directa tal como
se describe en la Patente Norteamericana 4365170
10 (Jennings) y en la Patente Norteamericana 4673574
(Anderson). Otros métodos se describen en las patentes
EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508.

Un método adicional implica el acoplamiento de un
polisacárido activado mediante bromuro de cianogén
15 derivado con hidrazida de ácido adípico (ADH) al
transportador de proteína mediante condensación de
carbodi-imida (Chu y Asociados, Infect. Immunity, 1983,
245-256).

20 Composiciones antigénicas que comprenden vesículas de membrana externa

Un aspecto preferido de la presente invención es la
activación o sobreexpresión de Tbp y Hsf en un OMV. Las
bacterias gram-negativas se separan del modo externo
mediante dos capas sucesivas de estructuras de
25 membrana, la membrana citoplásmica y la membrana
externa. La membrana externa de la bacteria gram-negativa
es dinámica y dependiendo de las condiciones ambientales
puede pasar por drásticas transformaciones morfológicas.
Entre estas manifestaciones, la formación de vesículas o
30 flictenas de membrana externa han sido estudiadas y

71

documentadas en muchas bacterias gram-negativas (Zhou y Asociados, 1998). Entre estos, una lista no exhaustiva de patógenos bacterianos reportados para producir flictenas incluyen: *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*,
5 *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Yersinia enterocolitica*. Aunque el mecanismo
10 bioquímico responsable de la producción de OMV/flictenas no es aún completamente comprendido, estas vesículas de membrana externa han sido ampliamente estudiadas ya que representan una metodología poderosa con el objeto de aislar preparaciones de proteína de membrana externa en
15 su conformación nativa. Dentro de dicho contexto, el uso de preparaciones de membrana externa es de particular interés para desarrollar vacunas contra *Neisseria*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Chlamydia*. Además, las
20 flictenas de membrana externa combinan múltiples antígenos proteináceos y no proteináceos que probablemente confieren una protección prolongada contra variantes intra-especie.

Las vesículas de membrana externa de la presente
25 invención, tendrán regulada Tbp y la proteína similar a Hsf (preferiblemente TbpA y Hsf). Esto se logra opcionalmente teniendo Tbp y la proteína similar a Hsf activadas en vesículas de membrana externa derivadas de una sola bacteria gram-negativa, preferentemente la cepa
30 *Neisseria*. Tbp y la proteína similar a Hsf también pueden

78

ser reguladas por separado en vesículas de membrana externa derivadas de diferentes cepas de bacteria gram-negativa, preferentemente cepas Neisserial. En una modalidad preferida, las diferentes cepas de Neisseria en las cuales se activan Tbp y la proteína similar a Hsf, más particularmente Tbp y Hsf serán un inmunotipo de *N. meningitidis* L2 y L3, ó L3 y L2, respectivamente.

La fabricación de las preparaciones de flictena procedentes de cepa Neisserial puede lograrse a través de cualesquiera de los métodos conocidos para los expertos en la técnica. Preferentemente, se utilizan los métodos descritos en las Patentes EP 301992, Patente Norteamericana 5,597,572, EP 11243 ó Patente Norteamericana 4,271,147, Frederikson y Asociados (NIPH Annals [1991], 14:67-80), Zollinger y Asociados (J. Clin. Invest. [1979], 63:836-848), Saunders y Asociados (Infect. Immun. [1999], 67:113-119), Drabick y Asociados (Vaccine [2000], 18:160-172) ó en la Publicación WO 01/09350 (Ejemplo 8). En general, se extraen los OMVs con un detergente, preferentemente desoxicolato, y opcionalmente se eliminan los ácidos nucleicos en forma enzimática. Se logra la purificación mediante ultracentrifugación seguida opcionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño. Si se incluyen dos o más flictenas diferentes de la presente invención, pueden combinarse en un solo contenedor para formar una preparación multivalente de la presente invención (aunque una preparación también se considera multivalente si las diferentes flictenas de la presente invención son composiciones separadas en contenedores separados los cuales se administran al mismo tiempo [la

misma visita al especialista] a un huésped. Las preparaciones OMV con frecuencia son esterilizadas mediante filtración a través de un filtro de 0.2 μ M, y se almacenan preferentemente en una solución de sacarosa (por ejemplo, 3%) la cual es conocida por estabilizar las preparaciones de filctena.

La activación de Tbp y la proteína similar a Hsf dentro de las preparaciones de vesícula de membrana externa pueden lograrse mediante la inserción de una copia extra de un gen dentro de la bacteria gram-negativa de la cual se deriva la preparación OMV. Como alternativa, el promotor de un gen puede intercambiarse por un promotor más fuerte en la cepa bacteriana de la cual se deriva la preparación OMV. Dichas técnicas se describen en la Publicación WO01/09350. La activación de una proteína conducirá a un mayor nivel de proteína que está presente en OMV, en comparación con el nivel de proteína presente en OMV derivado de *N. meningitidis* no modificada (por ejemplo celda H44/76). Preferentemente, el nivel será de al menos 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 7, 10 ó 20 veces mayor.

Cuando LPS se proyecta para ser un antígeno adicional en el OMV, se puede utilizar preferentemente un protocolo que utiliza una baja concentración de detergente de extracción (desoxicolato o DOC) en el método de preparación OMV, para conservar los altos niveles de LPS enlazados, en tanto que se elimina el LPS enlazado en forma deficiente, particularmente tóxico. La concentración de DOC utilizada es preferentemente de 0 a 0.5% DOC, más preferentemente de 0.2% a 0.4%, de 0.03% a 0.3%, de 0.04% a 0.2%, de 0.05% a .15%, de 0.05% a 0.2% DOC,

más preferentemente alrededor de o exactamente el 0.1% DOC.

El término "secuencia promotora más fuerte" se refiere a un elemento de control regulador que incrementa la transcripción de un gen que codifica el antígeno de interés.

El término "expresión de activación" se refiere a cualquier medio para aumentar la expresión de un antígeno de interés, relativo a dicha filctena no modificada (por ejemplo, que ocurre en forma natural). Quedará entendido que la cantidad de "activación" dependerá del antígeno de interés en particular, pero no excederá una cantidad que interrumpa la integridad de la membrana de la filctena. La activación del antígeno se refiere a la expresión que es al menos el 10% mayor que la de la filctena no modificada. Preferentemente, es al menos 50% mayor. Más preferentemente, es al menos el 100% mayor (2 veces). Más preferentemente, es al menos 3, 4, 5, 7, 10, 20 veces mayor. Preferentemente, el nivel de expresión se evalúa cuando las filctenas han sido derivadas de bacterias que crecen en condiciones limitadas de hierro (por ejemplo, la presencia de un quelador de hierro).

Como alternativa o en forma adicional, la expresión se puede referir a convertir la expresión no condicional en cambios metabólicos o nutricionales, particularmente en el caso de TbpA, TbpB, LbpA y LbpB.

Nuevamente con el propósito de ser más claros, los términos "construcción de una cepa bacteriana para producir menos de dicho antígeno" o "desactivación", se refiere a cualquier medio para reducir la expresión de un

antígeno (o la expresión de un producto de gen funcional) de interés, con relación al del no modificado (por ejemplo, una flictena que ocurre en la naturaleza), preferentemente mediante eliminación, de modo que la expresión sea al menos 10% más baja que la de la flictena no modificada. Preferentemente es al menos 50% más baja y más preferentemente está completamente ausente. Si la proteína desactivada es una enzima o una proteína funcional, la desactivación puede lograrse introduciendo una o más mutaciones que dan como resultado una reducción del 10%, 20%, 50%, 80%, ó preferentemente 100% en actividad enzimática o funcional.

Los pasos de construcción requeridos para modular la expresión de proteína Neisserial pueden llevarse a cabo en una variedad de formas conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden insertar secuencias (por ejemplo promotores o estructuras de lectura abierta) y se pueden interrumpir promotores/genes mediante la técnica de inserción de transposón. Por ejemplo, para la activación de la expresión de un gen, se puede insertar un promotor fuerte a través de un transposón de hasta 2 kb en la corriente ascendente del codón de inicio del gen (más preferentemente una corriente ascendente de 200 a 600 pares base, más preferentemente una corriente ascendente de aproximadamente 400 pares base). También se puede utilizar mutación de punto o eliminación (particularmente para desactivar la expresión de un gen).

Sin embargo, dichos métodos pueden ser muy inestables o inciertos y por consiguiente se prefiere que se lleve a cabo el paso de construcción a través de un caso

de recombinación homóloga. Preferentemente, el caso toma lugar entre una secuencia (o región recombinogénica) de al menos 30 nucleótidos en el cromosoma bacteriano, y una secuencia (una segunda región recombinogénica) de al menos 30 nucleótidos en un vector transformado dentro de la cepa. Preferentemente las regiones son de 40 a 1000 nucleótidos, más preferentemente de 100 a 800 nucleótidos, lo más preferentemente de 500 nucleótidos. Estas regiones recombinogénicas deben ser lo suficientemente similares para que tengan la capacidad de hibridar a otra bajo condiciones altamente estrictas.

Los métodos utilizados para llevar a cabo los casos de modificación genética aquí descritos (tal como la activación o desactivación de genes mediante casos de recombinación y de introducción de secuencias genéticas adicionales en un genoma *Neisseria*), se describen en la Publicación WO01/09350. Los promotores fuertes típicos que pueden ser integrados en *Neisseria* son *porA*, *porB*, *igtF*, *Opa*, *p110*, *Ist*, y *hpuAB*. *PorA* y *PorB* son preferidos como promotores fuertes, constitutivos. Se ha establecido que la actividad del promotor *PorB* está contenida en un fragmento que corresponde a la corriente ascendente de los nucleótidos del -1 al 250 del codón de inicio de *porB*.

Activación de expresión de proteína de adquisición de hierro mediante crecimiento bajo condiciones de limitación de hierro

La activación de proteína que enlaza transferrina en una preparación de vesícula de membrana externa de la presente invención, se logra preferentemente aislando las vesículas de membrana externa de una cepa paterna de

bacteria gram-negativa crecida bajo condiciones de limitación de hierro. Una baja concentración de hierro en el medio, dará como resultado una expresión de proteínas incrementada implicada en la adquisición de hierro, incluyendo TbpA y TbpB. La expresión de estas proteínas se activa por consiguiente sin la necesidad de modificar en forma recombinante el gen implicado, por ejemplo, insertando un promotor más fuerte o insertando una copia adicional del gen. La presente invención también puede comprender la activación de una proteína que enlaza transferrina mediante el crecimiento en un medio de limitación de hierro, en donde el gen también ha sido modificado en forma recombinante.

La limitación de hierro se logra mediante la adición de un quelador de hierro al medio de cultivo. Los queladores de hierro adecuados incluyen 2,2-dipirildil, EDDHA (ácido etilenodiamina-di(o-hidroxifenilacético), y Desferal (mesilato de desferoxamina, Sigma). El desferal es el quelador de hierro preferido y se agrega al medio de cultivo en una concentración de entre 10 y 100 μM , preferentemente 25 a 75 μM , más preferentemente 50 a 70 μM , lo más preferentemente 60 μM . El contenido de hierro del medio, viene principalmente del extracto de levadura y constituyentes de peptona de soya y la cantidad presente puede variar entre lotes. Por consiguiente, pueden ser óptimas diferentes concentraciones de Desferal para lograr la activación de proteínas de adquisición de hierro en diferentes lotes del medio. Los expertos en la técnica deben tener la capacidad de determinar fácilmente la concentración óptima. En términos básicos, se debe

agregar suficiente quelador de hierro al medio para activar la expresión de la proteína regulada por hierro deseada, pero no demasiado como para afectar de manera adversa el crecimiento de la bacteria.

5 Preferentemente, la activación de la proteína de enlace a transferrina mediante el crecimiento bajo condiciones limitadas en hierro, se combina con la activación mediante la proteína similar a Hsf, de modo que se logre la vesícula de membrana externa de la presente
10 invención.

Desactivación/eliminación de antígenos inmunodominantes variables y no protectores

Muchos antígenos de superficie son variables entre cepas bacterianas y como consecuencia protegen
15 únicamente contra un grupo limitado de cepas relacionadas en forma cercana. Un aspecto de la presente invención cubre las vesículas de membrana externa que comprenden Tbp y la proteína similar a Hsf, preferentemente TbpA y Hsf, en donde la expresión de la otra proteína se reduce, o,
20 preferentemente, se elimina el gen(es) que codifica la proteína(s) de superficie variable. Dicha eliminación da como resultado una cepa bacteriana que produce filctenas, las cuales cuando se administran en una vacuna, tienen un potencial mayor de reactividad cruzada contra diversas
25 cepas, debido a una mayor influencia ejercida por las proteínas conservadas (retenidas en las membranas externas) en el sistema inmune de la vacuna. Los ejemplos de dichos antígenos variables incluyen: para *Neisseria-pili* (PilC) que pasa por variaciones antigénicas, PorA, Opa, OpC, PilC, PorB, TbpB, FrpB; para *H. Influenza* - P2, P5,
30

pilina, IgA1-proteasa; y para *Moraxella* OMP106.

Otros tipos de gen que pudieran ser desactivados o cambiados son genes los cuales, in vivo, pueden ser activados (expresados) o desactivados fácilmente mediante la bacteria. Ya que las proteínas de membrana externa codificadas de dichos genes no siempre están presentes en las bacterias, la presencia de dichas proteínas en las preparaciones de flictena también puede ser perjudicial para la efectividad de la vacuna por las razones manifestadas anteriormente. Un ejemplo preferido para desactivar o eliminar es la proteína *Neisseria* Opc. La inmunidad anti-Opc inducida mediante una vacuna de flictena que contiene Opc, podría tener únicamente una capacidad protectora limitada ya que el organismo de infección podría ser convertido fácilmente en Opc⁺; *H. influenza* HgpA y HgpB son otros ejemplos de dichas proteínas.

Por ejemplo, estos genes variables y no protectores pueden ser desactivados en expresión, o terminalmente desconectados. Esto tiene la ventaja de concentrar el sistema inmune en antígenos mejores que se encuentran en bajas cantidades de la superficie externa de los flictenas.

En la Publicación WO01/09350 se describen métodos para desactivar la expresión.

Mediante la frase "desactivación de una proteína de membrana externa inmunodominante" se entiende que se disminuyen los niveles de expresión y preferentemente se desactivan, y que las mutaciones y/o eliminaciones de lazos inmunodominantes expuestos en la superficie hacen a la proteína de membrana externa menos inmunodominante.

Mediante la frase "desactivación de una proteína con función enzimática", se entiende que el nivel de expresión de la proteína se disminuye o preferentemente se desactiva, o puede significar que la expresión de la enzima funcional se reduce o elimina preferentemente.

La cepa de bacterias meningococales preferidas para utilizarse en la elaboración de composiciones inmunogénicas de la presente invención tienen desactivación, preferentemente la eliminación de 1, 2, ó 3 de PorA, OpA y OpC. Preferentemente PorA y OpA; PorA y OpC; OpA y OpC; PorA y OpA y OpC se desactivan.

Se conocen cuatro diferentes genes Opa para existir en el genoma meningococal (Aho y Asociados, 1991 Mol. Microbiol. 5:1429-37), por consiguiente cuando se dice que Opa será desactivado en la expresión, se entiende que también se desactivan preferentemente 1, 2, 3, o (preferentemente) los 4 genes que se encuentran en el meningococcus. Dicha desactivación puede llevarse a cabo en forma genética tal como se describe en la Publicación WO 01/09350 o buscando cepas meningococales estables, naturales, que se encuentran fácilmente que tienen una baja expresión o ninguna expresión de loci Opa. Dichas cepas pueden encontrarse utilizando la técnica descrita en la publicación de Poolman y Asociados (1985 J. Med. Micro. 19:203-209) en donde las células que son Opa⁻ tienen un diferente fenotipo a las células que expresan Opa, las cuales pueden observarse buscando en la apariencia de las células en las placas o bajo un microscopio. Una vez encontrada, la cepa puede mostrarse como Opa⁻ estable, llevando a cabo un manchado Western

en contenidos de células después de una corrida de fermentación para establecer la carencia de Opa.

Cuando la activación de la proteína que enlaza transferrina en las vesículas de membrana externa de la presente invención se logra mediante el crecimiento bajo condiciones de limitación de hierro, también se pueden activar las proteínas reguladas por hierro variables. Estas incluyen FrpB en *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae* (Microbiology 142; 3269-3274 (1996), J. Bacteriol. 181:2895-2901 (1999)), y la proteína C de utilización heme/hemopexina (J. Bacteriol. 177; 2644-2653 (1995)) y HgpA, HgpB y HgpC (Infect. Immun. 66; 4733:4741 (1998), Infect. Immun. 67; 2729-2739 (1999), Microbiology 145; 905-914 (1999)) en *Haemophilus influenzae*. Los inventores han descubierto que es conveniente desactivar la expresión de al menos las partes variables de dichas proteínas, cuando se utiliza la limitación de hierro para activar la expresión de la proteína que enlaza a transferrina. Esto se logra ya sea utilizando el proceso descrito en la Publicación WO01/09350 o eliminando la parte(s) variable de la proteína. Esto asegurará que la respuesta inmune provocada por la composición Inmunogénica se dirija hacia antígenos que se encuentran en un amplio rango de cepas. La desactivación de FrpB se combina preferentemente con la desactivación de PorA y OpA; PorA y OpC; OpA y OpC; PorA y OpA y OpC en las composiciones Inmunogénicas de flictena de la presente invención derivadas de cepas de bacterias gram-negativa, preferentemente cepas *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* ó *Neisseria* (más preferentemente

82

N. meningitidis). En una modalidad alternativa de la presente invención, se desactiva FrpB en vesículas de membrana externa que han sido preparadas a partir de cepas de bacterias gram-negativa, preferentemente cepas
5 *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* ó *Neisseria* (más preferentemente *N. meningitidis*), no crecidas preferentemente bajo condiciones de limitación de hierro.

Destoxificación de LPS

Los OMVs en la composición inmunogénica de la
10 presente invención, pueden ser destoxificados a través de métodos para destoxificación de LPS los cuales se describen en la publicación WO 01/09350. En particular, los métodos de destoxificación de LPS involucran la desactivación, preferentemente eliminación de las enzimas
15 hrtB y/o msbB las cuales se describen en la publicación WO 01/09350. Los mutantes de eliminación de estos genes están genotípicamente caracterizados mediante el LPS mutante msbB que pierde una cadena de acilo secundaria comparada con LPS mutantes tipo natural y hrtB que
20 pierden 2 (o ambas) de las cadenas de acilo secundarias. Dichos métodos se combinan preferentemente con métodos de extracción OMV que implican bajos niveles de DOC, preferentemente 0 a 0.3% DOC, más preferentemente 0.05 a 0.2% DOC, lo más preferentemente alrededor de 0.1%
25 DOC.

Los métodos adicionales de destoxificación LPS incluyen agregar a las preparaciones de filctena un
equivalente funcional de péptido no tóxico de polimixina B [una molécula con alta afinidad con el lípido A]
30 (preferentemente SAEP 2) (ver las publicaciones WO

84

93/14115, WO 95/03327, Velucchi y Asociados (1997) J. Endotoxin Res. 4:1-12, y en la patente 976402 para detalles adicionales de equivalentes funcionales de péptidos no tóxicos de polimixina B - particularmente el uso
5 de SAEP 2 del péptido (de la secuencia KTKCKFLKKC en donde 2 cisteínas forman un puente de disulfuro)).

Polisacáridos de reacción cruzada

El aislamiento de flictenas de membrana externa bacteriana procedentes de bacterias gram-negativas
10 encapsuladas, con frecuencia da como resultado la copurificación de polisacáridos capsulares. En algunos casos, este material "contaminante" puede probar ser útil, ya que el polisacárido puede aumentar la respuesta inmune conferida mediante otros componentes de flictenas. Sin
15 embargo, en otros casos, la presencia de material de polisacárido contaminante en preparaciones de flictena bacterianas puede probar ser perjudicial para el uso de flictenas en una vacuna. Por ejemplo, se ha mostrado que al menos en el caso de *N. meningitidis* que el polisacárido
20 capsular de serogrupo B no confiere Inmunidad protectora y es susceptible a inducir una respuesta autoinmune adversa en humanos. En consecuencia, se pueden aislar vesículas de membrana externa de la presente invención a partir de una cepa bacteriana para la producción de flictena, que ha
25 sido construido de modo que quede libre de polisacáridos capsulares. Las flictenas posteriormente serán adecuados para utilizarse en humanos. Un ejemplo particularmente preferido de dicha preparación de flictena, es uno del *N. meningitidis* serogrupo B desprovisto de polisacáridos
30 capsulares. En general, el aislamiento de vesículas de

membrana externa debe ser de cepas de bacterias gram-negativas que no pueden sintetizar polisacáridos capsulares, particularmente cuando la cepa es un mutante msbB como el descrito anteriormente.

5 Esto se puede lograr utilizando cepas de producción de flictena modificadas, en las cuales se han dañado los genes necesarios para la biosíntesis capsular y/o exportación. La desactivación del gen que codifica la biosíntesis o exportación de polisacáridos capsulares
10 puede lograrse mediante mutación (mutación, eliminación o inserción de punto) de cualquier región de control, la región de codificación o ambas (utilizando preferentemente las técnicas de recombinación homóloga descritas anteriormente) o mediante cualquier otra forma de
15 disminución de función enzimática de dichos genes. Además, la desactivación de genes de biosíntesis capsular también puede lograrse mediante la sobreexpresión de antisentido o mutagénesis de transposón. Un método preferido es la eliminación de parte o todos los genes de
20 polisacáridos capsulares (cps) de *Neisseria meningitidis* requeridos para la biosíntesis de exportación de polisacáridos. Para este propósito, el plásmido de reemplazo pMF121 (descrito en la publicación de Frosh y Asociados, 1990, *Mol. Microbiol.* 4:1215-1218) se puede
25 utilizar para administrar una mutación que elimine la aglomeración del gen cpsCAD (+ galE).

 Cuando las composiciones inmunogénicas de la presente invención se derivan de una cepa de meningococcus B, se prefiere además que también se
30 elimine el polisacárido capsular (el cual también contiene

estructuras de sacáridos similares a las de los humanos). Aunque muchos genes pueden ser desactivados para lograr esto, los inventores han mostrado de manera conveniente que es preferible que la cepa de producción de flictena
5 haya sido construida en forma genética para desactivar en forma permanente la expresión del producto del gen funcional del gen siaD (por ejemplo, desactivando la actividad de polisialiltransferasa α -2-8), cambiando preferentemente el gen, más preferentemente eliminando
10 todo o parte del promotor y/o estructura de lectura abierta del gen. Dicha desactivación se describe en la Publicación WO 01/09350. La mutación siaD (también conocida como synD) es la más conveniente de muchas mutaciones que dan como resultado la eliminación de epítipo similar al
15 humano procedente del polisacárido capsular, debido a que es una de las únicas mutaciones que no afecta la biosíntesis de los epítopos protectores de LOS, siendo conveniente por lo tanto, en un proceso que ayuda a la utilización final de LOS como un antígeno protector, y tiene
20 un efecto mínimo en el crecimiento de las bacterias. Un aspecto preferido de la presente invención, es por consiguiente, una preparación inmunogénica de flictena tal como se describe anteriormente, la cual es derivada de una cepa mutante de meningococcus B lgtE⁻, siaD⁻, lgtA⁻, siaD⁻,
25 o preferentemente lgtB⁻, siaD⁻. La propia cepa, es un aspecto adicional de la presente invención.

Aunque es preferible la mutación siaD⁻ por las razones anteriores, se pueden utilizar otras mutaciones que desactivan la síntesis del polisacárido Neisserial
30 (preferentemente meningococcus B). Por lo tanto, la cepa

de producción de flictena puede ser construida en forma genética para desactivar preferentemente la expresión del producto de gen funcional de uno o más de los siguientes genes: ctrA, ctrB, ctrC, ctrD, los genes synA (equivalente a synX y siaA), synB (equivalente a siaB) o synC (equivalente a siaC), preferentemente mediante la desactivación del gen, más preferentemente, eliminando toda o parte del promotor y/o estructura de lectura abierta del gen. La mutación lgtE⁻ puede combinarse con una o más de estas mutaciones. Preferentemente, la mutación lgtB⁻ se combina con una o más de estas mutaciones. Un aspecto adicional de la presente invención, es por consiguiente una preparación inmunogénica de flictena tal como la que se describe anteriormente, la cual se deriva de dicha cepa mutante combinada de meningococcus B. La propia cepa es un aspecto adicional de la presente invención.

La heterogeneidad dentro de la parte del oligosacárido de LPS, genera diversidad estructural y antigénica entre diferentes cepas Neisserial (Griffiss y Asociados, Inf. Immun. 1987; 55:1792-1800). Esto ha sido utilizado para subdividir las cepas meningococales en 12 inmunotipos (Scholtan y Asociados, J. Med. Microbiol. 1994, 41:236-243). Los Inmunotipos L3, L7 y L9 son inmunológicamente idénticos y estructuralmente similares (o incluso los mismos) y han sido designados por consiguiente L3, 7, 9 (o, para los propósitos de la presente especificación, genéricamente, "L3"). El LPS meningococal L3,7,9 (L3), L2 y L5 pueden ser modificados mediante sialilación, o mediante la adición de ácido 5'-monofosfato-

N-acetilneuramínico de citidina. Aunque los LPS L2, L4 y L6 son inmunológicamente distinguibles, son estructuralmente similares y cuando se menciona L2 en la presente invención, ya sea L4 ó L6 pueden ser
5 opcionalmente substituidos dentro del alcance de la presente invención. Ver la publicación de M.P. Jennings y Asociados, Microbiology 1999, 145, 3013-3021 y Mol. Microbiol 2002, 43:931-43 para una ilustración adicional de la estructura y heterogeneidad de LPS.

10 La seguridad de anticuerpos elevados a LPS L3 ó L2 ha sido cuestionada, debido a la presencia de una estructura similar al grupo de oligosacárido lacto-N-neotetraosa ($\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-$) presente en glicosfingolípidos humanos. Incluso si un mayor número
15 de personas han sido vacunadas en forma segura con vacunas de vesículas extraídas mediante desoxicolato que contienen una cantidad residual de LPS L3 (G. Bjune y Asociados, Lancet (1991), 338, 1093-1096; GVG, Sierra y Asociados, NIPH ann (1991), 14, 195-210), la eliminación
20 de la parte terminal del LOS sacarídico es conveniente para evitar cualquier reacción cruzada con estructuras que se encuentran en la superficie de tejidos humanos. En una modalidad preferida, la desactivación del gen *lgtB* da como resultado una estructura LPS intermedia en la cual están
25 ausentes el residuo de galactosa terminal y el ácido siálico (la mutación deja una estructura $4\text{GlcCAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-$ en LOS L2 y L3). Dichos intermediarios podrían obtenerse en una cepa LPS L3 y L2. Una versión alternativa y menos preferida (corta) del LPS, puede
30 obtenerse desactivando el gen *lgtE*. Una versión alternativa

adicional y menos preferida de LPS puede obtenerse apagando el gen lgtA. Si se selecciona la mutación lgtA⁻ es preferible también apagar la expresión lgtC para evitar que se forme el inmunotipo L1 no inmunogénico.

5 Los mutantes LgtB⁻ son los más preferidos, ya que los inventores de la presente invención han descubierto que ésta es la truncación óptima para resolver el aspecto de seguridad, mientras se retiene un epítotope de oligosacáridos preferidos LPS que pueden inducir aún a
10 una respuesta de anticuerpos bactericidas.

Por consiguiente, las composiciones inmunogénicas de la presente invención que contienen además preparaciones L2 ó L3 (ya sea purificadas o en un flictena aislada), o preparaciones de flictena meningococales en
15 general, se derivan de manera conveniente de una cepa Neisserial (preferentemente meningococal) que ha sido construida en forma genética para desactivar en forma permanente la expresión del producto del gen funcional procedente del gen lgtB, lgtA, ó lgtE, preferentemente,
20 desactivando el gen, más preferentemente eliminando todo o parte del promotor y/o estructura de lectura abierta del gen.

Un locus Neisserial que contiene diversos genes lgtB e lgtB, y sus secuencias son conocidas en la técnica (ver
25 M.P. Jennings y Asociados, Microbiology 1999, 145, 3013-3021 y las referencias ahí mencionadas, y J. Exp. Med. 180:2181-2190 [1994].

En preparaciones de flictena, particularmente en preparaciones extraídas con bajas concentraciones DOC,
30 se puede utilizar LPS como un antígeno en la composición

inmunogénica de la presente invención, sin embargo es conveniente desactivar y/o eliminar la función enzimática ya sea de IgtE, IgtA (particularmente en combinación con IgtC), o, preferentemente, productos de genes/gen IgtB, con el objeto de eliminar las estructuras lacto-N-neotetraosa similares a las de los humanos. El locus Neisserial (y secuencia del mismo) que comprende los genes Igt para la biosíntesis de la estructura de oligosacáridos LPS, es conocido en la técnica (Jennings y Asociados, Microbiology 1999, 145; 3013-3021 y las referencias ahí mencionadas, y J. Exp. Med. 180:2181-2190 [1994]). La desactivación/eliminación de IgtB (o producto de gen funcional es preferido ya que deja intacto el epítipo protector LPS.

En preparaciones de flictena de *N. meningitidis* de serogrupo B de la presente invención, es preferible la desactivación/eliminación tanto de siaD como de IgtB (aunque también se puede utilizar una combinación de IgtB⁻ con cualesquiera de ctrA⁻, ctrB⁻, ctrD⁻, synA⁻ (que equivalen a synX⁻ y siaA⁻), synB⁻ (que equivale a siaB⁻) o synC⁻ (que equivale a siaC⁻) en una cepa de producción de flictena de meningococcus B) lo que conduce a una preparación de flictena con una óptima seguridad y retención del epítipo protector LPS.

La composición inmunogénica de la presente invención puede comprender al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco diferentes preparaciones de vesícula de membrana externa. Cuando se incluyen dos o más preparaciones OMV, se activa al menos un antígeno de la presente invención en cada OMV. Dichas preparaciones

OMV pueden derivarse de cepas *Neisserial* de la misma especie y serogrupo, o preferentemente de cepas *Neisserial* de diferente clase, serogrupo, serotipo, subserotipo o Inmunotipo. Por ejemplo, una composición
 5 Inmunogénica puede comprender una o más preparaciones de vesícula de membrana externa que contenga LPS de Inmunotipo L2 y una o más preparaciones de vesícula de membrana externa que contengan LPS de preparaciones de Inmunotipo L3, L2 ó L3 OMV son preferentemente derivadas
 10 de una cepa estable la cual tiene una mínima variabilidad de fase en el locus del gen de síntesis de oligosacáridos LPS.

Preparaciones de filctena *Neisserial* preferidas

Además de Hsf y Tbp, se prefieren uno o más de los
 15 siguientes genes (que codifican los antígenos protectores) para la activación cuando se lleva a cabo en una cepa *Neisserial*, incluyendo gonococcus y meningococcus (particularmente *N. meningitidis* B): NspA (WO 96/29412), Hap (PCT/EP99/02766), PorA, PorB (NMB 2039), OMP85
 20 (WO 00/23595), PilQ (PCT/EP99/03603), PldA (PCT/EP99/06718), FrpB (WO 96/31618), FrpA/FrpC (WO 92/01460), LbpA/LbpB (PCT/EP98/05117), FhaB (WO 98/02547), HasR (PCT/EP99/05989), Ilpo2 (PCT/EP99/08315), MltA (WO 99/57280), MafA (NMB 0652),
 25 MafB (NMB 0643), Omp26 (NMB 0181), adhesina NMB 0315, adhesina NMB 0995, adhesina NMB 1119, P2086 (NMB 0399), Lipo28 (NMB 2132), NM-ADPRT (NMB 1343), VapD (NMB 1753) y ctrA (PCT/EP00/00135). También son preferidos como genes que puedan introducirse en forma
 30 heteróloga en otras bacterias gram-negativa.

Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la desactivación: PorA, PorB, PilC, LbpA, LbpB, Opa, Opc, htrB, msbB y lpxK.

5 Uno o más de los siguientes genes son preferidos para la activación: pmrA, pmrB, pmrE, y pmrF.

Las secuencias de control represivas preferidas que serán modificadas son: la región operadora *fur* (particularmente ya sea para cualquiera o ambos de los genes TbpB ó LpbB); y la región de operador DtxR.

10 Uno o más de los siguientes genes son preferidos para desactivación: galE, siaA, siaB, siaC, siaD, ctrA, ctrB, ctrC, y ctrD.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención, también pueden comprender preparaciones 15 OMV/flietena derivadas de bacteria gram-negativa que incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, y *Haemophilus influenzae* b.

Preparaciones de flietena de *Pseudomonas aeruginosa* preferidas

20 Además de Hsf y Tbp, uno o más de los siguientes genes (que codifican los antígenos protectores) son preferidos para activación: PcrV, OprF, OprI. También se prefieren como genes que puedan introducirse en forma heteróloga en otras bacterias gram-negativa.

25 Preparación de flietena de *Moraxella catarrhalis* preferidas

Además de Hsf y Tbp, uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) son preferidos para activación: OMP106 (WO 97/41731 y WO 96/34960), HasR (PCT/EP99/03824), PilQ (PCT/EP99/03823), OMP85 30 (PCT/EP00/01468), lipo06 (GB 9917977.2), lipo10 (GB

9918208.1), lipo11 (GB 9918302.2), lipo18 (GB 9918038.2), P6 (PCT/EP99/03038), ompCD, CopB (Helminen ME, y Asociados (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010), D15 (PCT/EP99/03822), Omp1A1 (PCT/EP99/06781), Hly3
 5 (PCT/EP99/03257), LbpA y LbpB (WO 98/55606), TbpA y TbpB (WO 97/13785, WO95/13370 y WO 97/32980), OmpE, UspA1 y UspA2 (WO 93/03761), y Omp21. También son preferidos como genes que puedan ser introducidos en forma heteróloga en otras bacterias gram-negativa.

10 Uno o más de los siguientes genes son preferidos para desactivación: CopB, OMP106, OmpB1, LbpA, y LbpB.

 Uno o más de los siguientes genes son preferidos para desactivación: htrB, msbB y lpxK.

15 Uno o más de los siguientes genes son preferidos para activación: pmrA, pmrB, pmrE, y pmrF.

Preparaciones de flictena de *Haemophilus influenzae* preferidas

 Además de Hsf y Tbp, uno o más de los siguientes genes (que codifican los antígenos protectores) son
 20 preferidos para activación: D15 (WO 94/12641, WO95/12641), P6 (EP 281673), P2, P5 (WO 94/26304), OMP26 (WO 97/01638), HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, Hia, Hap, Hln47, y Hif (todos los genes en este operón debe ser activados con el objeto de activar pilin). También son
 25 preferidos como genes que pueden ser introducidos en forma heteróloga en otras bacterias gram-negativa.

 Uno o más de los siguientes genes son preferidos para desactivación: P2, P5, Hif, IgA1-proteasa, HgpA, HgpB, HMW1, HMW2, Hxu, htrB, msbB y lpxK.

30 Uno o más de los siguientes genes son preferidos

para activación: pmrA, pmrB, pmrE, y pmrF.

Preferentemente, las composiciones o vacunas inmunogénicas de la presente invención, no consisten de y/o comprenden las combinaciones particulares de las SEQ
5 IDs descritas en la tabla que abarca de la página 3, línea 18 a la página 52, línea 2 de la Publicación WO 00/71725 y/o cualquier combinación individual descrita en los ejemplos del 1 al 11 de la Publicación WO 00/71725.

Preferentemente además en forma alternativa,
10 cualesquiera combinaciones individuales descritas en la Publicación WO 01/52885 no están reivindicadas en la presente invención.

Formulaciones de vacunas

Una modalidad preferida de la presente invención, es
15 la formulación de la composición inmunogénica de la presente invención en una vacuna que también puede comprender un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La fabricación de preparaciones de vesícula de
20 membrana externa procedentes de cualesquiera de las cepas modificadas mencionadas anteriormente, se puede lograr a través de cualesquiera de los métodos conocidos para los expertos en la técnica. Preferentemente se utilizan los métodos descritos en las Patentes EP 301992, Patente
25 Norteamericana US 5,597,572, EP 11243 ó Patente Norteamericana US 4,271,147. Más preferentemente, se utiliza el método descrito en la Publicación WO 01/09350.

La preparación de vacuna generalmente se describe en la publicación de Diseño de Vacunas ("The subunit and
30 adjuvant approach" (eds. Powell M.F. & Newman M.J.)

(1995) Plenum Press Nueva York).

Las composiciones antigénicas de la presente invención pueden ser adyuvadas en la formulación de vacuna de la presente invención. Los adyuvantes
5 adecuados incluyen una sal de aluminio, tal como gel de hidróxido de aluminio (alum) o fosfato de aluminio, aunque también puede ser una sal de calcio (particularmente carbonato de calcio), hierro o zinc o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares
10 acilados, polisacáridos derivados en forma catiónica o aniónica, o polifosfacenos.

Los sistemas adyuvantes Th1 adecuados que pueden utilizarse incluyen, lípido A de monofosforilo, particularmente lípido A de monofosforilo 3-de-O-acilado, y
15 una combinación de lípido A de monofosforilo, preferentemente lípido A de monofosforilo 3-3-de-O-acilado (3D-MPL) junto con una sal de aluminio. Un sistema mejorado comprende la combinación de un lípido A de monofosforilo y un derivado de saponina, particularmente
20 la combinación de QS21 y 3D-MPL, tal como se describe en la Publicación WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en donde QS21 se extingue con colesterol, tal como se describe en la Publicación WO 96/33739. Una formulación adyuvante particularmente potente que
25 comprende QS21 3D-MPL y tocoferol en un aceite en emulsión de agua, se describe en la Publicación WO95/17210 y es una formulación preferida.

La vacuna puede comprender una saponina, más preferentemente QS21. También puede comprender un
30 aceite en una emulsión de agua y tocoferol. Los

95

oligonucleótidos que contienen CpG no metilado (Publicación WO 96/02555) también son inductores preferenciales de una respuesta Th1 y son adecuados para utilizarse en la presente invención.

5 La preparación de vacuna de la presente invención, se puede utilizar para proteger o tratar un mamífero susceptible a infección, por medio de administrar la vacuna a través de ruta sistémica o de mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de rutas
10 intramusculares, intraperitoneales, intradérmicas o subcutáneas; o a través de administración mucosal a los tractos oral/alimenticio, respiratorio o genitourinario. Por lo tanto un aspecto de la presente invención, es un aspecto para inmunizar un huésped humano contra una enfermedad
15 originada contra una infección de una bacteria gram-negativa, en donde el método comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la preparación de flictena de la presente invención.

La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna, se
20 selecciona como una cantidad la cual induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos, importantes en vacunas típicas. Dicha cantidad variará dependiendo de cuál inmunogén específico se emplea y de cómo se presenta. Generalmente, se espera que cada dosis
25 comprenda de 1 a 100 µg de antígeno de proteína, preferentemente 5 a 50 µg y lo más normalmente dentro del rango de 5 a 25 µg.

Una cantidad óptima de una vacuna en particular puede lograrse mediante estudios estándar que
30 comprenden la observación de respuestas inmunes

96

adecuadas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o diversas Inmunizaciones de refuerzo separadas en forma adecuada.

Polinucleótidos de la presente invención

5 El término "polinucleótido", se refiere de manera general a un polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, el cual puede ser ARN ó ADN no modificado o ARN ó ADN modificado. Los "polinucleótidos" incluyen, sin limitación ADN de un solo hilo o hilo doble,
10 ADN que es una mezcla de regiones con un solo hilo e hilo doble, ARN de un solo y de hilo doble, y ARN que es una mezcla de regiones con un solo hilo y con hilo doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de un solo hilo, o más típicamente, de doble
15 hilo o una mezcla de regiones con un solo hilo y con doble hilo. Además, el término "polinucleótido" se refiere a regiones de tres hilos que comprenden ARN o ADN, o tanto ARN como ADN. El término "polinucleótido", también incluye ADNs ó ARNs que contienen una o más bases
20 modificadas y ADNs ó ARNs con esqueletos modificados para estabilidad o por otras razones. El término bases "modificadas" incluye, por ejemplo, bases tritiladas y bases no usuales, tales como inosina. Se han realizado una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por lo tanto, el
25 "polinucleótido" abarca formas modificadas en forma química, enzimática, o metabólica tal como se encuentran normalmente en la naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células. El término "polinucleótidos" también abarca polinucleótidos
30 relativamente cortos, con frecuencia referidos como

oligonucleótidos.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a una formulación inmunológica/de vacuna que comprende uno o más polinucleótidos que codifican Tbp y la proteína similar a Hsf, particularmente aquellos que corresponden a combinaciones de proteínas de la presente invención. Dichas técnicas son conocidas en el arte, ver por ejemplo la Publicación de Wolff y Asociados, Science, (1990) 247:1465-8.

La expresión de Tbp y la proteína similar a Hsf, preferentemente TbpA y Hsf en dicho polinucleótido, podría estar bajo el control de un promotor eucariótico, con la capacidad de conducir la expresión dentro de una célula mamífera. El polinucleótido puede comprender además una secuencia que codifica otros antígenos. Los ejemplos de dichos promotores eucarióticos, incluyen promotores procedentes de virus que utilizan células mamíferas como huésped, incluyendo promotores de adenovirus, promotores retrovirales. Como una alternativa, los promotores mamíferos pueden utilizarse para conducir la expresión de TbpA y la proteína similar a Hsf.

Anticuerpos e inmunización pasiva

Otro aspecto de la presente invención es el uso de una composición inmunogénica que comprende TbpA y proteína similar a Hsf para generar inmunoglobulina que se puede utilizar para tratar de evitar infección mediante bacteria gram-negativa o preferentemente *Neisseria*, o preferentemente *Neisseria meningitidis* y lo más preferentemente *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

Las inóculas para la producción de anticuerpos

policlonales, normalmente se preparan dispersando la composición antigénica en un diluyente fisiológicamente tolerable, tal como solución salina u otros adyuvantes adecuados para uso humano, para formar una composición acuosa. Una cantidad inmunoestimuladora de inóculo se administra a un mamífero y el mamífero inoculado posteriormente se mantiene durante un tiempo suficiente para que la composición antigénica induzca anticuerpos protectores.

Los anticuerpos pueden ser aislados hasta el grado deseado mediante técnicas conocidas, tales como cromatografía por afinidad.

Los anticuerpos pueden incluir preparaciones de antisuero procedentes de una variedad de animales comúnmente utilizados, por ejemplo, cabras, primates, monos, cerdos, caballos, cerdos de guinea, ratas u hombres. A los animales se les extrae sangre y se recupera el suero.

Una inmunoglobulina producida de acuerdo con la presente invención, puede incluir anticuerpos completos, o fragmentos o subfragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD, ó IgE, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidad doble para Tbp y Hsf. También pueden ser fragmentos, por ejemplo F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares, incluyendo los fragmentos híbridos. Una inmunoglobulina también puede incluir proteínas naturales, sintéticas o construidas en forma genética que actúe en forma similar al anticuerpo que está enlazando a antígenos específicos

para formar un complejo.

Se puede administrar una vacuna de la presente invención a un receptor, el cual posteriormente actúa como una fuente de inmunoglobulina, producida en respuesta al estímulo procedente de la vacuna específica. Por lo tanto un sujeto tratado de este modo, podrá donar plasma del cual se podrá obtener hiperinmúnoglobulina a través de metodología de fraccionación de plasma convencional. La hiperinmúnoglobulina podrá administrarse a otro sujeto con el objeto de impartir resistencia contra, o para tratar, infección por *Neisseria*. Las hiperinmúnoglobulinas de la presente invención, son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de enfermedad por *Neisseria* en infantes, e individuos comprometidos inmunológicamente o cuando se requiere tratamiento y no existe tiempo de que el individuo produzca anticuerpos en respuesta a la vacunación.

Un aspecto adicional de la presente invención, es una composición farmacéutica que comprende anticuerpos monoclonales que reaccionan contra TbpA y Hsf que se pueden utilizar para tratar o evitar infección por bacteria gram-negativa, preferentemente *Neisseria*, más preferentemente *Neisseria meningitidis* y lo más preferentemente *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

Dichas composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos monoclonales que pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase, por ejemplo IgG, IgM, IgA, IgD, ó IgE, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidad doble para Tbp y proteína similar a Hsf. También pueden ser fragmentos, por ejemplo F(ab')₂, Fab', Gav, Fv, y similares, incluyendo fragmentos híbridos.

Los métodos para elaborar anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir la fusión de esplenocitos con células de mieloma (Kohler y Milstein 1975 Nature 256; 495; Antibodies - a laboratory manual Harlow and Lane 1988). Como alternativa, se pueden obtener fragmentos monoclonales Fv clasificando una biblioteca de despliegue de fago adecuado (Vaughan TJ y Asociados, 1998 Nature Biotechnology 16; 535). Los anticuerpos monoclonales también pueden ser humanizados o humanizados en parte, utilizando técnicas que son bien conocidas en el arte.

Ensayo bactericida de suero

El ensayo bactericida de suero es el método preferido para evaluar la relación sinérgica entre antígenos, cuando se combinan en una composición inmunogénica.

Dicha respuesta sinérgica está caracterizada por el SBA provocado por la combinación de antígenos que es de al menos el 50%, dos veces, tres veces, preferentemente cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces y lo más preferentemente diez veces más que el SBA provocado por cada antígeno por separado. Preferentemente, SBA se mide contra una cepa homóloga de la cual se derivan los antígenos y también preferentemente contra un panel de cepas heterólogas (ver posteriormente un panel representativo, por ejemplo BZ10 (B:2b:P1.2) que pertenece a la aglomeración A-4; B16B6 (B:2a:P1.2) que pertenece al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1.7,16). SBA es el marcador inmunológico más normalmente elegido para estimar la eficacia de una vacuna meningococal (Perkins y Asociados, J. Infect. Dis. 1998, 177:683-691). El SBA satisfactorio puede lograrse a

101

través de cualquier método conocido. El SBA puede llevarse a cabo utilizando sueros obtenidos de modelos animales (ver ejemplos 6 a 9) o de sujetos humanos.

Un método preferido adicional para llevar a cabo SBA con sueros humanos, es el que se indica a continuación. Se toma una muestra de sangre antes de la primera vacunación, dos meses después de la segunda vacunación y un mes después de la tercera vacunación (tres vacunaciones en un año que son un programa de vacunación primario para humanos típica administrado en, por ejemplo, 0, 2 y 4 meses, ó 0, 1, y 6 meses). Los programas de vacunación humana primaria pueden llevarse a cabo en infantes menores a un año (por ejemplo, al mismo tiempo que se llevan a cabo las vacunaciones Hib) o de dos a cuatro años o adolescentes que también pueden ser vacunados para probar el SBA con un programa de vacunación primario. Se puede tomar una muestra de sangre adicional de los 6 a 12 meses posteriores a la vacunación primaria, y un mes después de una dosis de refuerzo, si es que aplica.

El SBA será satisfactorio para un antígeno o preparación de flictena con actividad bactericida homóloga, si un mes después de la tercera dosis de vacunación (del programa de vacunación primaria) (en de 2 a 4 años o adolescentes, aunque preferentemente en infantes en el primer año de vida), el porcentaje de sujetos con un incremento de cuatro veces en términos de titulador SBA (dilución de anticuerpo) comparado con titulador previo a la vacuna contra la cepa de meningococcus del cual se derivaron los antígenos de la presente invención, es mayor al 30%, preferentemente mayor al 40%, más

105

preferentemente mayor al 50% y lo más preferentemente mayor al 60% de los sujetos.

Por supuesto, un antígeno o preparación de flictena con actividad bactericida heteróloga también puede
5 constituir una preparación de flictena con actividad bactericida homóloga, si también produce un SBA satisfactorio contra la cepa meningococal de la cual se deriva.

SBA será satisfactorio para un antígeno o preparación
10 de flictena con actividad bactericida heteróloga, si un mes después de la tercera dosis de vacunación (del programa de vacunación primario) (en de 2 a 4 años o adolescentes, aunque preferentemente en infantes en el primer año de vida), el porcentaje de sujetos con un incremento de cuatro
15 veces en términos de titulador SBA (dilución de anticuerpo) (comparado con titulador previo a la vacuna) contra tres cepas heterólogas de meningococcus es mayor al 20%, preferentemente mayor al 30%, más preferentemente mayor al 35% y lo más preferentemente mayor al 40% de los
20 sujetos. Dicha prueba es una buena indicación de si el antígeno o preparación de flictena con actividad bactericida heteróloga puede incluir anticuerpos bactericidas cruzados contra diversas cepas meningococales. Las tres cepas heterólogas deben tener preferentemente diferentes
25 patrones de generación de tipo de secuencia de locus múltiple (MLST) o complejo-tipo electroforético (ET) (ver la publicación de Malden y Asociados, PNAS EUA 1998, 95:3140-5) para cada uno de los otros y preferentemente al de la cepa de la cual el antígeno o preparación de flictena
30 con actividad bactericida heteróloga se elabora o deriva. Un experto en la técnica también tendrá la capacidad de

determinar tres cepas con diferentes complejo-ET que reflejen la diversidad genética observada entre meningococcus, particularmente entre cepas de meningococcus tipo B que son reconocidas como la causa de carga de enfermedad significativa y/o que representan linajes hiper-virulentos de MenB reconocidos (ver publicación de Malden y Asociados, *supra*). Por ejemplo, tres cepas que pueden utilizarse son las siguientes: BZ10 (B:2b:P1.2) que pertenece a la aglomeración A-4; B16B6 (B:2a:P1.2) que pertenece al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1.7,16) que pertenece al complejo ET-5 o cualesquiera otras cepas que pertenecen al mismo ET/aglomeración. Dichas cepas se pueden utilizar para probar un antígeno o preparación de filctena con actividad bactericida heteróloga elaborada o derivada de, por ejemplo, la cepa meningococal Cu385 (B:4:P1.15) que pertenece al complejo ET-5. Otra cepa de muestra que se puede utilizar procede del clon epidémico de linaje 3 (por ejemplo NZ124 [B:4:P1.7,4]). Otra cepa ET-37 es NGP165 (B:2a:P1.2).

Los procesos para medir la actividad de SBA son conocidos en la técnica. Por ejemplo en la Publicación WO 99/09176 en el ejemplo 10C, se describe un método que puede ser utilizado. En términos generales, un cultivo de cepa que será probado se crece (preferentemente en condiciones de agotamiento de hierro - mediante la adición de un quelador de hierro tal como EDDA al medio de crecimiento) en la fase log de crecimiento. Esto se puede suspender en un medio con BSA (tal como medio Hanks con 0.3% de BSA) con el objeto de obtener una suspensión celular de trabajo ajustada aproximadamente 20,000

105

CFU/ml. Se puede elaborar una serie de mezclas de reacción, mezclando una serie de diluciones de suero al doble que serán probadas (preferentemente desactivadas por calor a una temperatura de 56°C durante 30 minutos) [por ejemplo en un volumen de 50 µl/depósito] y la suspensión de cepa meningococal de 20,000 CFU/ml que será probada (por ejemplo en un volumen de 25 µl/depósito). Los frascos de reacción deben ser incubados (por ejemplo, a temperatura de 37°C durante 15 minutos) y agitados (por ejemplo a 210 rpm). La mezcla de reacción final [por ejemplo en un volumen de 100 µl] contiene además una fuente complementaria [tal como 25% de volumen final o suero de conejo recién nacido probado previamente], y se incuba tal como se indicó anteriormente [por ejemplo, a una temperatura de 37°C durante 60 minutos]. Para este ensayo se puede utilizar una placa microtituladora de 96 depósitos de fondo en forma de U de poliestireno estéril. Se puede tomar una alícuota (por ejemplo 10 µl) de cada depósito, utilizando una pipeta de canal múltiple, y gotearse sobre placas de ágar Mieller-Hinton (que contienen preferentemente 1% de Isovitalex y 1% de Suero de Caballo desactivado con calor) e incubadas (por ejemplo durante 18 horas a una temperatura de 37°C en CO₂ al 5%). Preferentemente, se ponen en contacto clones individuales de hasta 80 CFU por alícuota. Las siguientes tres muestras de prueba, se pueden utilizar como controles: regulador + bacteria + complemento; regulador + bacteria + complemento desactivado; suero + bacteria + complemento desactivado. Los tituladores SBA pueden ser calculados en forma sencilla utilizando un programa que procese los datos para producir una medida

de la dilución que corresponde al 50% de las células exterminadas mediante un cálculo de regresión.

Todas las referencias o solicitudes de patente citadas en la presente especificación de patente, están
5 incorporadas a la misma como referencia.

Los ejemplos que se encuentran más adelante, se llevan a cabo utilizando técnicas estándar, las cuales son bien conocidas y de rutina para los expertos en la técnica, excepto en donde se describe con detalle lo contrario. Los
10 ejemplos son ilustrativos, aunque no limitan la presente invención.

Ejemplo 1: Métodos para construir cepas de *Neisseria meningitidis* de serogrupo B, utilizadas en preparaciones de vesícula de membrana externa

15 La Publicación WO01/09350 proporciona métodos detallados para preparar vesículas de membrana externa y manipular las cepas bacterianas de las cuales las vesículas de membrana externa se derivan. Cuando las vesículas de membrana externa son para retener lipoproteínas, tales
20 como TbpB y/o lipopolisacáridos, se prefieren métodos de aislamiento con bajos niveles o sin desoxicolato.

**Ejemplo 2: Activación del antígeno de proteína Hsf en una cepa de *Neisseria meningitidis* de serogrupo B recombinante que carece de genes *cps* funcionales aunque
25 expresa PorA**

Tal como se describe en los ejemplos de la Publicación WO01/09350, en ciertos países, la presencia de PorA en vesículas de membrana externa puede ser conveniente, y puede reforzar la eficacia de la vacuna de
30 flictenas mejorados en forma recombinante. En el ejemplo

107

106

que se encuentra a continuación, se ha utilizado un vector pCMK(+) modificado para activar la expresión del antígeno de proteína Hsf en una cepa que carece de genes *cps* funcionales pero que expresa PorA. El vector pCMK(+) original contiene un promotor *porA/lacO* quimérico representado en el huésped *E. coli* que expresa *lacI^q*, aunque transcripcionalmente activo en *Neisseria meningitidis*. En el vector pCMK(+) modificado, el promotor *porA* nativo se utilizó para conducir la transcripción del gen Hsf. El gen que codifica Hsf fue amplificado mediante PCR utilizando los cebadores de oligonucleótidos HSF 01-*NdeI* y HSF 02-*NheI*, presentados en la tabla que se encuentra a continuación. Debido a que se expresó la secuencia del cebador HSF 01-*NdeI* de la proteína Hsf, contendrá dos residuos de metionina en el extremo 5'. Las condiciones utilizadas para la amplificación PCR fueron las descritas por el proveedor (polimerasa de ADN HIFI, Boehringer Mannheim, GmbH). El ciclado térmico fue como se indica a continuación: 25 veces (temperatura de 94°C 1 minuto, 48°C 1 minuto, 72°C 3 minutos) y una vez (temperatura a 72°C 10 minutos, 4°C hasta la recuperación). El amplicón correspondiente se clonó subsecuentemente en los sitios de restricción correspondiente del vector de suministro pCMK(+). En este plásmido recombinante, designado pCMK(+)-Hsf, se eliminó el *lacO* presente en el promotor *porA/lacO* mediante una estrategia PCR recombinante. Se utilizó el plásmido pCMK(+)-Hsf como una plantilla para amplificación PCR de dos fragmentos de ADN por separado.

30 - fragmento 1 que contiene la región recombinógeno *porA* 5', el gen de resistencia a canamicina y el promotor

AB

porA. Los cebadores de oligonucleótidos se utilizaron RP1(SacII) y RP2, se presentan en la tabla que se encuentra más adelante. El cebador RP1 es homólogo a la secuencia justo de la corriente ascendente del operador *lac*.

- fragmento 2 que contiene la secuencia Shine-Dalgarno del gen *porA*, el gen *hsf*, y la región recombinogénica *porA* 3'. Los cebadores de oligonucleótidos utilizados, RP3 y RP4(*Apal*), se presentan en la tabla que se encuentra más adelante. El cebador RP3 es homólogo a la secuencia justo de la corriente descendente del operador *lac*. El extremo 3' de fragmento 1 y el extremo 5' de fragmento 2, tienen 48 bases que traslapan. Se utilizaron 500 ng de cada PCR (1 y 2) para una reacción PCR final utilizando los cebadores RP1 y RP4. El amplicón final obtenido fue subclonado en el vector pSL1180 restringido con *SacII* y *Apal*. El plásmido modificado fue purificado a gran escala utilizando el equipo maxiprep QIAGEN y 2 µg de este material se utilizó para transformar una cepa de *Neisseria meningitidis* de serogrupo B que carece de genes *cps* funcionales. Con el objeto de conservar la expresión de *porA*, se seleccionó la integración que resulta de un solo cruce mediante una combinación de procedimientos de clasificación PCR y de manchado Western. Se realizaron pruebas positivas de los clones resistentes a canamicina mediante PCR específico de *porA* y de manchado Western se almacenaron a una temperatura de -70°C en la forma de existencias de glicerol y se utilizaron para estudios adicionales. Se suspendieron nuevamente bacterias (que corresponden a aproximadamente a bacterias $5 \cdot 10^8$) en 50 µl de regulador

108

PAGE-SDS, congelados (-20°C)/calentados (100°C) tres veces y posteriormente se separaron mediante electroforesis Whole-cell en un gel de al 12.5%. Se examinó la expresión de Hsf en lisados bacterianos de célula completa (WCBL) derivados de *Nmb* [Cps-, PorA+_ ó *NmB* [Cps-, PorA+, Hsf+]. La tinción Coomassie detectó un incremento significativo en la expresión de Hsf (con respecto al nivel Hsf endógeno). Este resultado confirma que el vector pCMK(+)-Hsf modificado es funcional y se puede utilizar en forma exitosa para activar la expresión de las proteínas de membrana externa, sin abolir la producción del antígeno de proteína de membrana externa PorA mayor.

15 Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

	Oligonucleótidos	Secuencia	Marcas(s)
	Hsf 01-Nde	5'-GGA ATT CCA TAT GAT GAA CAA AAT ATA CCG C-3'	sitio de clonación NdeI
	Hsf 02-Nhe	5'-GTAGCT AGC TAG CTT ACC ACT GAT AAC CGA C-3'	sitio de clonación Nhe I
20	GFP-mut-Asn	5'-AAC TGC AGA ATT AAT ATG AAA GGA GAA GAA CTT TTC-3'	sitio de clonación AsnI compatible con NdeI
	GFP-Spc	5'-GAC ATA CTA GTT TAT TTG TAG AGC TCA TCC ATG-3'	sitio de clonación SphI compatible con NheI
	RP1 (SacII)	5'-TCC CCG CCG GCC GTC TGA ATA CAT CCC GTC-3'	sitio de clonación SacII
25	RP2	5'-CAT ATG GGC TTC CTT TTG TAA ATT TGA GGG CAA ACA CCC GAT ACG TCT TCA-3'	
	RP3	5'-AGA CGT ATC GGG TGT TTG CCC TCA AAT TTA CAA AAG GAA GCC CAT ATG-3'	
30	RP4(ApaI)	5'-GGG TAT TCC GGG CCC TTC AGA CGG CGC AGC AGG-3'	sitio de clonación ApaI

MD

Ejemplo 3: Activación del gen de *N. meningitidis* de serogrupo B mediante reemplazo de promotor

El objetivo del experimento, fue reemplazar la región promotora endógena del gen TbpA mediante el promotor *porA* fuerte, con el objeto de activar la producción del antígeno TbpA. Para dicho propósito, se construye un plásmido de reemplazo de promotor utilizando metodologías de clonación *E. coli*. Se descubrió una región de ADN (731 pares base) localizada en la corriente ascendente de la secuencia de codificación TbpA, en la base de datos privada Incyte PathoSeq del ATCC 13090 de la cepa *N. meningitidis*. Este ADN contiene la secuencia que codifica el antígeno TbpB. Los genes se organizan en un operón. El gen TbpB será eliminado y reemplazado mediante la cinta del promotor *CmR/porA*. Para dicho propósito, se amplificó mediante PCR un fragmento de ADN de 3218 pares base que corresponde a la región de flanco 5' de 509 pares base del gen *tbpB*, la secuencia de codificación TbpB de 2139 pares base, la secuencia intergénica de 87 pares base y los primeros 483 pares base de la secuencia de codificación TbpA, procedentes de ADN genómico de *Neisseria meningitidis* de serogrupo B utilizando los oligonucleótidos **BAD16** (5'- GGC CTA GCT AGC CGT CTG AAG CGA TTA GAG TTT CAA AAT TTA TTC-3') y **BAD17** (5'-GGC CAA GCT ICA GAC GGC GTT CGA CCG AGT TTG AGC CTT TGC-3') que contienen secuencias de captación y sitios de restricción *NheI* y *HindIII* (subrayados). Se lizó este fragmento PCR con un equipo High Pure (Boehringer Mannheim, Alemania) y se clonaron directamente en un vector pGemT (Promega, EUA). Este plásmido fue presentado a mutagénesis PCR de círculo

AAA

(Jones & Winistofer (1992)) con el objeto de (i) insertar sitios de restricción adecuados que permiten la clonación de una cinta promotora *CmR/PorA* y (ii) para eliminar 209 pares base de la secuencia de flaqueo 5' de *tbpB* y la secuencia de codificación *tbpB*. Se llevó a cabo PCR de círculo utilizando el BAD 18 (5'-TCC CCC GGG AAG ATC TGG ACG AAA AAT CTC AAG AAA CCG-3') y el BAD 19 (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG CAA ATT TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGC AAC AGC AAC ATT TGT TCC G-3') oligonucleótidos que contienen sitios de restricción adecuados *XmaI*, *BglI* y *XhoI* (subrayados). Se amplificó la cinta del promotor *CmR/PorA* a partir del plásmido pUC D15/Omp85 descrito previamente, utilizando cebadores BAD21 (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3') y BAD20 (5'-TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3') que contienen sitios de restricción adecuados *XmaI*, *SpeI*, *BglII*, y *XhoI* (subrayados). Este fragmento PCR se clonó en el plásmido PCR de círculo. Este plásmido se utilizará para transformar las cepas *Neisseria meningitidis* serogrupo B [*cps*] y [*cps-porA*]. La integración mediante un doble cruce en la región de corriente ascendente de *tbpA*, dirigirá la inserción del promotor *porA* directamente en la corriente ascendente del ATG *tbpA*.

Ejemplo 4: Construcción de la cepa de *N. meningitidis* de serogrupo B activada para la expresión de dos antígenos: TbpA y Hsf.

El objetivo del experimento fue activar la expresión simultáneamente de TbpA y Hsf en la misma cepa de *N. meningitidis* de serogrupo B. Se activó la producción de TbpA reemplazando su región promotora endógena por el

promotor *porA* fuerte (reemplazo de promotor). Dentro de este contexto, se eliminó el gen *tbpB* localizado en la corriente ascendente de *tbpA*, y la proteína TbpB no se presenta en la membrana externa.

5 Se activo la expresión de Hsf mediante la inserción (recombinación homóloga) de una segunda copia del gen correspondiente en el locus *porA* (suministro de gen). Se han descrito ambas cepas en una patente por separado referida como la publicación WO 01/09350. Los
10 marcadores de selección utilizando en ambas estrategias (Cm^{R} OKAn^R) permitieron la combinación de ambas integraciones en el mismo cromosoma.

 Se extrajo el ADN genómico total de la cepa *Nm.B cps-/TbpA+/PorA+* recombinante mediante el protocolo de
15 punta 500-G Qiagen Genomic. Se restringieron diez μg de ADN o/n con enzimas de restricción *DraIII* y se utilizaron para transformar *Neisseria meningitidis* de serogrupo B a través del protocolo de transformación clásico. Las células utilizadas para la transformación fueron ya sea *NmB cps-*
20 /*Hsf+/PorA+* recombinante (recombinación homóloga mediante un cruce en el locus *porA*) o *NmB cps-/Hsf+/PorA-* (intercambio alélico/recombinación homóloga mediante 2 cruces en el locus *porA*). Se plaquearon durante la noche una placa de agar GC que contiene 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de
25 canamicina, diluida a $\text{DO}_{650}=0.1$ en un medio líquido GC de 10mM MgCl_2 , y se incubaron a 6 horas a una temperatura de 37°C bajo agitación vigorosa con 10 μg de ADN genómico restringido por *DraIII*. El *Neisseria meningitidis* recombinante que resultó de un cruce doble en el evento
30 (clasificación PCR) se seleccionó en un medio GC que contiene 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de canamicina y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de

MS

cloramfenicol y se analizaron con respecto a la expresión TbpA y Hsf en preparaciones OMV. Tal como se representó en la figura 1, se incrementó en forma significativa la producción tanto de TbpA como de Hsf en el OMV preferido
5 preparado a partir de la cepa de *NmB* TbpA/Hsf cuando se comparó con el OMV preparado a partir de las cepas de control *NmB cps*. El nivel de sobre expresión de cada proteína en el recombinante doble, es comparable con el nivel de expresión obtenida en los recombinantes solos
10 correspondientes. El nivel de sobre expresión de TbpA y Hsf fue comparable en las cepas PorA+ y PorA- (datos no mostrados). Todos juntos, estos datos demuestran que: (i) la expresión de TbpA y Hsf puede ser activada en forma unida y concomitante en *N. meningitidis* y (ii) las flictenas
15 recombinantes enriquecidas con TbpA y Hsf, se pueden obtener y utilizar para Inmunización.

Análisis de contenido Hsf y TbpA de Vesículas de Membrana Externa.

SDS-PAGE teñido con azul Coomassie.

20 Se diluyeron 15 µg de proteína en preparaciones de vesícula de membrana externa con activación de Hsf ó TbpA o tanto Hsf como TbpA en un regulador de muestra que contiene β-mercaptoetanol y calentado a una temperatura de 95°C durante 10 minutos. Posteriormente
25 las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Novex 4-20% Tris-glicina 1.5 mm 2Dwell SDS Page), se tiñeron en azul Coomassie durante una hora y se destiñeron con diversos lavados de destinte. Los resultados se muestran en la figura 1, la cual muestra que
30 el nivel de Hsf y TbpA es considerablemente mayor en preparaciones de vesícula de membrana externa, derivados

de *N. meningitidis* en donde se ha mejorado su nivel de expresión.

Ejemplo 5: Inmunogenicidad de OMVs con Activación de Hsf y/o TbpA

5 Se inmunizaron tres veces grupos de 20 ratones con OMV mediante ruta intramuscular a los días 0, 21 y 28. Cada inoculación se realizó de 5 µg (contenido de proteína) de OMVs formulado en AlPO₄ con MPL. Los OMVs fueron derivados de la cepa *N. meningitidis* H44/76,
10 construidos de modo que los polisacáridos capsulares y PorA fueran desactivados. Se realizó una comparación de OMVs en la cual Hsf, TbpA, tanto Hsf como TbpA o ninguno, fueron activados. El día 41, se tomaron muestras para análisis mediante ELISA o mediante ensayo
15 bactericida de suero.

Ensayo ELISA para detectar anticuerpos contra Hsf

 Se recubrieron micro placas de 96 depósitos (Nunc, Maxisorb) durante la noche a una temperatura de 4°C con 100 µl de 1 µg/ml de antígeno específico en PBS. Después
20 de lavar con NaCl 150 mM Tween 20 0.05%, se saturaron las placas con 100 µl de PBS-BSA al 1% bajo agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Entre cada paso (llevado a cabo bajo agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y con PBS-BSA al 0.2% como regulador
25 diluyente), se eliminaron los reactivos en exceso mediante lavado con NaCl-Tween 20. Se agregaron cien microlitros de muestras de suero diluido con microdepósitos. Se reconocieron los anticuerpos enlazados mediante un Ig anti-ratón biotinilado (Prosan) (1/2000). Se reveló el
30 complejo de antígeno-anticuerpo mediante incubación con conjugado de peroxidasa biotinilado con estreptavidina

(Amersham) (1/4000). Se utilizó OrtoFenilenoDiamina/H₂O₂ (4 mg/10 ml de regulador de citrato 0.1M pH 4.5 + 5 µl de H₂O₂), para revelar el ensayo. Las placas fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad antes de detener la reacción, mediante la adición de 50 µl de HC1 1N. La absorbancia fue medida a 490nm.

	Titulador Punto Medio (sobre suero reunido)
g1, flictenas TbpA-HSF, IM	15471
g2, flictenas TbpA, IM	15.41
g3, flictenas HSF, IM	14508
g4, flictenas CPS(-)PorA(-), IM	-
g5, MPL/AIPO4, IM	-

Los resultados mostrados en la tabla anterior muestran que los tituladores de anticuerpos altos y equivalentes contra Hsf, fueron elevados mediante inmunización con OMVs con activación de Hsf o tanto Hsf como TbpA. Virtualmente no se pudo detectar ningún anticuerpo contra Hsf en sueros surgidos después de la inoculación con adyuvante solo u OMV, en donde ni Hsf ni TbpA habían sido activadas u OMV, en el cual únicamente se había activado TbpA.

Ejemplo 6: Actividad Bactericida de Suero de antisuero surgido contra OMVs con activación de Hsf y/o TbpA

Se comparó la actividad bactericida de antisueros procedentes de ratones inoculados con OMVs con activación de Hsf, TbpA, tanto Hsf como TbpA o sin activación, en ensayos que utilizan ya sea la cepa homóloga H44/76 o la cepa heteróloga Cu385. El ensayo bactericida de suero ha sido mostrado, para ilustrar una buena correlación con la protección y por lo tanto es una

ATG

buena indicación de que tan efectivo será una composición candidata en provocar una respuesta inmune protectora.

Las cepas *Neisseria meningitidis* de serogrupo B tipo natural (cepa H44/76=B:15 P1.7,16 L3,7,9 y cepas
5 CU385=B:4P1.19, 15 L3,7,9) se cultivaron durante la noche en MH + 1% Polivitex + 1% de suero de caballo en platos de Petri a una temperatura de 37°C + 5% de CO₂. Se subcultivaron durante 3 horas en un medio TSB líquido suplementado con 50 µM de Desferal (quelador de hierro) a
10 una temperatura de 37°C bajo agitación, para alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 0.5 a 470 nm.

Se desactivaron los sueros reunidos o individuales durante 40 minutos a una temperatura de 56°C. Las muestras de suero fueron diluidas 1/100 en HBSS-BSA al
15 0.3% y posteriormente se diluyeron en serie dos veces (8 diluciones) en un volumen de 50 µl en micro placas de fondo redondo.

Las bacterias, en el OD adecuado, fueron diluidas en HBSS-BSA al 0.3% para producir 1.3×10^4 CFU por ml. Se
20 agregaron 37.5 µl de esta dilución a las diluciones de suero y se incubaron las microplacas durante 15 minutos a una temperatura de 37°C bajo agitación. Posteriormente, se agregaron 12.5 µl de complemento de conejo a cada depósito. Después de 1 hora de incubación a una
25 temperatura de 37°C y bajo agitación, se colocaron las microplacas en hielo para detener el exterminio.

Utilizando el método de inclinación, se plaquearon 20 µl de cada depósito en MH + 1% Polivitex + 1% de suero de caballo en platos de Petri y se incubaron durante la noche
30 a una temperatura de 37°C +CO₂. Los CFU's fueron contados y se calculó el porcentaje de exterminio. El

MT

titulador bactericida de suero es la última dilución que produce un exterminio de 50%.

5

OMV	H44/76		CU385	
	GMT	% de respuesta	GMT	% de respuesta
CPS(-) PorA (-)	83	30%	58	5%
CPS(-) PorA (-) Hsf	158	40%	108	20%
CPS(-) PorA (-) TbpA	327	80%	147	30%
CPS(-) PorA (-) Hsf - TbpA	3355	100%	1174	80%

Se obtuvieron resultados similares a los que se muestran en la tabla anterior, en otros dos experimentos similares.

Se observó un incremento dramático en los tituladores bactericidas (GMT) contra la cepa homóloga y una cepa heteróloga después de la vacunación con OMV en donde se activaron tanto Hsf como TbpA. Por comparación, los GMTs bactericidas medidos en ratones vacunados con OMVs activados con Hsf ó TbpA, fueron similares a los obtenidos con ratones vacunados con OMVs de control.

También se observó de manera clara el beneficio de una activación doble observada en el porcentaje de ratones que producen un nivel significativo de anticuerpos bactericidas (tituladores mayores a 1/100), particularmente en experimentos que utilizan la cepa heteróloga.

Ejemplo 7: Efecto de mezclar los sueros anti-Hsf y anti-TbpA en la actividad bactericida

Se inmunizaron tres veces grupos de 20 ratones con OMV mediante ruta intra-muscular en los días 0, 21 y 28. Cada inoculación se elaboró de 5 µg (contenido de proteína) de OMVs formulados en AlPO4 con MPL. Se derivaron los OMVs de la cepa *N. meningitidis* H44/76, construida de modo que los polisacáridos capsulares y

PorA fueron desactivados. Se inmunizó un grupo de ratones con OMVs de control en los cuales no existió activación de las proteínas. En un segundo grupo, se activó la expresión Hsf, en un tercer grupo se activó la expresión TbpA y en un cuarto grupo se activo la expresión tanto de Hsf como de TbpA.

Se reunieron los sueros, utilizando ya sea sueros procedentes de ratones que se encuentran en el mismo grupo o mezclando sueros aislados del grupo en donde se había activado Hsf solo o TbpA solo. Se midió la actividad bactericida de suero para cada uno de los sueros reunidos y los resultados se muestran en la tabla que se encuentra a continuación.

SBA realizado en sueros reunidos procedentes de ratones inmunizados con fliclina	Titulador SBA
TbpA-Hsf fliclinas	774
TbpA fliclinas	200
Hsf fliclinas	50
CPS(-) PorA(-) fliclinas	50
Mezclar sueros anti-TbpA + anti-Hsf	1162

Los resultados en la tabla anterior, muestran que el mezclado de antisueros anti-Hsf y anti-TbpA dio como resultado una actividad bactericida de suero mucho mayor que la que se logró mediante cualquier antisuero individual. El efecto sinérgico parece lograrse por la presencia de anticuerpos tanto contra Hsf como TbpA.

Ejemplo 8: Las proteínas Hsf truncadas pueden combinarse sinérgicamente con TbpA

Se realizó una serie de construcciones de Hsf truncado utilizando procedimientos de biología molecular estándar. Estos incluyen una construcción que codifica los aminoácidos del 1 al 54 que contiene la secuencia de señal

de Hsf y los aminoácidos 134 a 592 de Hsf (Tr1Hsf). Un
segundo Hsf truncado contenía los aminoácidos del 1 al 53
de la secuencia de señal de Hsf seguido de los
aminoácidos 238 a 592 de Hsf (Tr2Hsf). Estas dos
5 construcciones de Hsf truncados y Hsf de longitud total,
fueron introducidos en la cepa de *N. meningitidis* B MC58
slad-, Opc-, PorA-, de modo que su expresión pudiera ser
activada y se produjeran vesículas de membrana externa
utilizando los métodos descritos anteriormente.

10 Se adsorbieron preparaciones de vesícula de
membrana externa en Al(OH)3 y se inyectaron en ratones
en los días 0, 21 y 28. En el día 42, a los ratones se les
extrajo sangre y se prepararon los sueros. Los sueros
fueron mezclados con sueros procedentes de ratones
15 vacunados con OMVs de TbpA activado y se llevaron a
cabo ensayos bactericidas de suero tal como se describió
anteriormente.

Resultados

Grupo	Tituladores Bactericidas de Suero	
	H44/76	CU385
MC58 PorA+slad+	25600	25600
MC58 PorA-slad-Hsf	1530	800
MC58 PorA-slad-Tr1Hsf	1015	1360
MC58 PorA-slad-Tr2Hsf	50	50
Control negativo	50	50
TbpA + MC58 PorA + slad+	25600	24182
TbpA + MC58 PorA - slad- Hsf	2565	1438
TbpA + MC58 PorA - slad-Tr1Hsf	4363	2891
TbpA + MC58 PorA-slad-Tr2Hsf	1568	742
TbpA + Control negativo	778	532

Los resultados mostrados en la tabla anterior revelan
que la primera truncación (Tr1Hsf) provoca una respuesta
inmune que tiene la capacidad de combinarse con
30 antisueros contra TbpA para producir una mayor actividad

bactericida de suero que cuando se utilizó Hsf de longitud total. Sin embargo, el grado de truncación es importante y la truncación producida en Tr2 tiene un efecto perjudicial comparado con el Hsf de longitud total. Se observó la actividad bactericida mejorada de Tr1Hsf, contra ambas de las cepas utilizadas.

Ejemplo 9: Actividad bactericida de suero de anticuerpos contra TbpA, Hsf y una tercera proteína meningococal.

Se utilizó la cepa de *N. meningitidis* H86/76 en la cual se desactivaron, tal como se describió anteriormente, PorA y los polisacáridos capsulares, como la cepa de soporte para activar TbpA y Hsf, LbpB, D15, PilQ ó NspA utilizando el procedimiento descrito anteriormente. Se prepararon vesículas de membrana externa de cada cepa tal como se describió anteriormente. Se elaboraron FhaB, FrpC, FrpA/C y Hap recombinante utilizando técnicas conocidas en el arte, tal como se describe en los documentos PCT/EP99/02766, WO92/01460 y WO98/02547.

Se adsorbieron sobre Al(OH)₃ preparaciones de vesícula de membrana externa y proteínas recombinantes y se inyectaron en ratones los días 0, 21 y 28. El día 42, a los ratones se les extrajo sangre y se prepararon los sueros. Los sueros contra OMVs activados mediante TbpA y Hsf fueron mezclados con sueros procedentes de ratones vacunados con OMVs de LbpB, D15, PilQ ó NspA activado o FhaB, FrpC, FrpA/C ó Hap recombinante y se llevaron a cabo ensayos bactericidas de suero tal como se describió anteriormente.

Resultados

Los resultados se muestran en la tabla que se

120

encuentran a continuación. En ensayos que utilizan la cepa H44/76 homóloga, la adición de los anticuerpos contra el tercer antígeno meningococal, con la excepción de FrpC, no produjeron un titulador bactericida de suero mayor al que se produjo utilizando anticuerpos contra TbpA y Hsf solo.

Sin embargo, la adición de anticuerpos contra un tercer antígeno fue conveniente en ensayos bactericidas de suero utilizando una cepa heteróloga. Los anticuerpos contra D15 (OMP85), Hap, FrpA/C y LbpB fueron particularmente efectivos en incrementar el titulador bactericida de suero contra las cepas CU385.

Mezcla de Antisueros	Titulador Bactericida de Suero	
	H44/76	CU385
anti-TbpA-Hsf y suero no inmune	5378	2141
anti-TbpA-Hsf y anti-FhaB	5280	2583
anti-TbpA-Hsf y anti-Hap	4577	5150
anti-TbpA-Hsf y anti-FrpA/C	5034	4358
anti-TbpA-Hsf y anti-LbpB	5400	4834
anti-TbpA-Hsf y anti-D15	4823	4857
anti-TbpA-Hsf y anti-PIQ	4708	2242
anti-TbpA-Hsf y anti-NapA	4738	2518
anti-TbpA-Hsf y anti-FrpC	8082	2300

Ejemplo 10: Efecto de FrpB KO en vesículas de membrana externa con respecto a su capacidad para provocar una respuesta inmune bactericida en cepas homólogas y heterólogas

Se utilizaron dos cepas de H44/76 N. meningitidis para preparar preparaciones de vesícula de membrana externa tal como se describe en la publicación WO01/09350, utilizando una extracción DOC al 0.1%, de modo que el contenido de LOS fue de alrededor del 20%. La cepa B1733 es slaD(-), PorA(-), y tiene la activación de Tr1 Hsf (ejemplo 8) e lgtB es eliminado. La cepa B1820

A22

121

B1733 es *slsD*(-), *PorA*(-), y tiene una activación de *Tr1* *Hsf*, *IgtB* es eliminado y *FrpB* también es eliminado. Ambas cepas fueron cultivadas en un medio suplementado con 60 µM de Desferal, de modo que se activaron las
5 proteínas reguladas con hierro tales como *LbpA/B* y *TbpA/B*.

Las preparaciones de flictena se adsorbieron en *Al(OH)3* y se inyectaron 5 µg en forma intramuscular en grupos de 30 ratones en el día 0 y día 21. Se tomaron
10 muestras de sangre en el día 28.

Los ensayos bactericidas de suero se llevaron a cabo en tres cepas L3 (la cepa H44/76 tipo natural homóloga y dos cepas L3 heterólogas; NZ124 y M97250687), tal como se describe en el ejemplo 6.

15 **Resultados**

Flictenas utilizados para inoculación	H44/76		M97250687		NZ124	
	GMT	SC	GMT	SC	GMT	SC
B1733	1518	30/30	151	11/30	70	4/29
B1820	781	19/30	1318	24/30	278	19/30

GMT indica el titulador promedio geométrico en el
20 SBA.

SC indica el número de sero conversión de ratones (tituladores SBA >1/100).

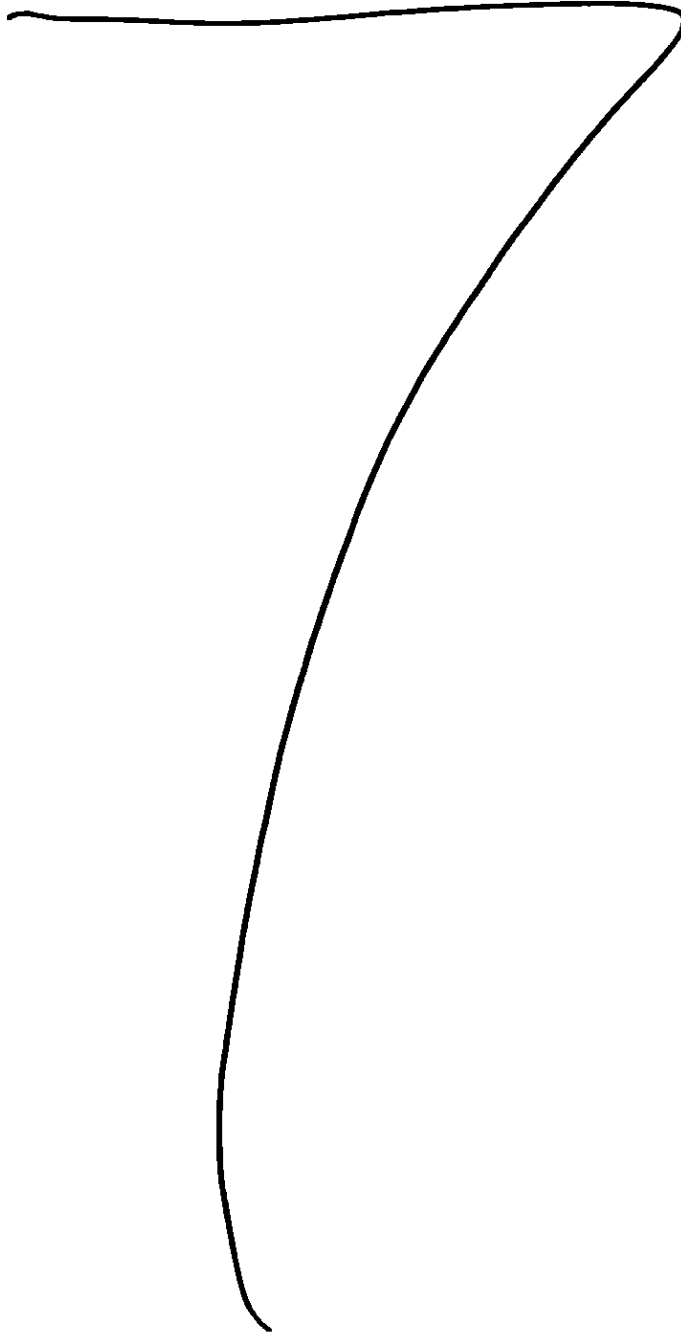
Los resultados muestran claramente que las flictenas *FrpB* KO (B1820) inducen una mejor respuesta bactericida cruzada heteróloga que las flictenas *FrpB*(+) (B1733). Los
25 tituladores SBA fueron mayores y existió una mayor proporción de ratones seroconvertidos en las cepas M97250687 y NZ124. Los resultados en la cepa homóloga, no fueron tan buenos como cuando se eliminó *FrpB*.

30 Estos datos sugieren que *FrpB* conduce la respuesta

A23

122.

inmune, ya que esta proteína de membrana externa es altamente variable, los anticuerpos contra esta proteína tienen la capacidad únicamente de inducir el exterminio de la cepa homóloga.



OCT

REIVINDICACIONES

1.- Una composición inmunogénica que comprende una proteína de enlace a transferrina aislada (Tbp) o
5 fragmento antigénico de la misma y una proteína similar a Hsf aislada o un fragmento antigénico de la misma procedente de la misma bacteria Gram negativa o una diferente.

2.- La composición inmunogénica de conformidad
10 con la reivindicación 1, caracterizada porque la proteína que enlaza a transferrina o fragmento de la misma y la proteína similar a Hsf o fragmento de la misma, son procedentes de *Neisseria*.

3.- La composición inmunogénica de conformidad
15 con la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque la proteína que enlaza a transferrina o fragmento de la misma, se deriva de *N. meningitidis*.

4.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la
20 proteína similar Hsf o fragmento de la misma se deriva de *N. meningitidis*.

5.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizada porque la proteína de enlace a transferrina o fragmento de
25 la misma se deriva de *N. meningitidis* de serogrupo B.

6.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 5, caracterizada porque la proteína similar a Hsf o fragmento de la misma, se deriva de *N. meningitidis* de serogrupo B.

7.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 6, caracterizada porque la proteína que enlaza a transferrina o fragmento de la misma se deriva de *N. gonorrhoeae*.

5 8.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizada porque la proteína similar a Hsf o fragmento antigénico de la misma se deriva de *N. gonorrhoeae*.

10 9.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 8, caracterizada porque la proteína que enlaza a transferrina o fragmento antigénico del mismo se deriva de *Moraxella catarrhalis*.

15 10.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 9, caracterizada porque la proteína similar a Hsf o fragmento antigénico de la misma se deriva de *Moraxella catarrhalis*.

20 11.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 10, caracterizada porque la proteína que enlaza a transferrina o fragmento antigénico de la misma se deriva de *Haemophilus influenzae*.

25 12.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 11, caracterizada porque la proteína similar a Hsf o fragmento antigénico de la misma, se deriva de *Haemophilus influenzae*.

13.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 12, caracterizada porque la proteína que enlaza a transferrina es TbpA o un fragmento antigénico de la misma.

125

14.- La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 13, caracterizada porque comprende una forma TbpA de peso molecular alto o una forma TbpA de peso molecular bajo o una forma TbpA tanto de peso molecular alto como una forma TbpA de peso molecular bajo.

15.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 14, caracterizada porque la proteína similar a Hsf es Hsf o un fragmento antigénico de la misma.

16.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 15, caracterizada porque comprende fragmentos antigénicos de proteína similar a Tbp y/o Hsf con la capacidad de generar una respuesta protectora contra infección por *Neisseria*1 *Moraxella catarrhalis* o *Haemophilus influenzae*.

17.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 17, caracterizada porque comprende fragmentos antigénicos de TbpA y/o Hsf.

18.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 17, caracterizada porque una proteína de fusión de proteína similar a Tbp y Hsf o fragmentos antigénicos de la misma.

19.- La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 18, caracterizada porque comprende una proteína de fusión que comprende TbpA y Hsf o fragmentos antigénicos de la misma con la capacidad de generar una respuesta protectora contra infección por *Neisseria*1.

127

126

20.- Una composición inmunogénica aislada que comprende una preparación de vesícula de membrana externa derivada de bacteria Gram negativa, en la cual la expresión tanto de proteína de enlace a transferrina como a proteína similar Hsf es de al menos 1.5 veces más que la ocurre en forma natural en la bacteria Gram negativa no modificada.

21.- La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 20, caracterizada porque la expresión de la proteína que enlaza a transferrina se activa mediante el crecimiento bajo condiciones de limitación de hierro.

22.- La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 20 y 21, caracterizada porque al menos parte de la preparación de vesícula de membrana externa se deriva de *Neisseria*.

23.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 22, caracterizada porque al menos parte de la preparación de vesícula de membrana externa se deriva de *Neisseria*.

24.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 23, caracterizada porque al menos parte de la preparación de vesícula de membrana externa se deriva de *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

25.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 22, caracterizada porque al menos parte de la preparación de vesícula de membrana externa se deriva de *Neisseria gonorrhoeae*.

128

127

26.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 25, caracterizada porque la célula huésped de la cual se deriva la preparación de vesícula de membrana externa ha sido
5 construida para desactivar la expresión de uno o más de LgtB y LgtE, preferentemente el primero.

27.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 26, caracterizada porque la célula huésped de la cual se deriva la
10 preparación de vesícula de membrana externa no tiene la capacidad de sintetizar polisacáridos capsulares y ácido construida preferentemente para desactivar la expresión de, y eliminar preferentemente la expresión de, uno o más de siaD, ctrA, ctrB, ctrC, ctrD, synA, (que equivalen a synX
15 y siaA), synB (que equivalen a siaB y synC) (que equivalen a siaC), más preferentemente siaD.

28.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 27, caracterizada porque la célula huésped de la cual se deriva la
20 preparación de vesícula de membrana externa ha sido construida para desactivar la expresión de, y eliminar preferentemente uno o más de, OpC, OpA y PorA, preferentemente PorA.

29.- La composición inmunogénica de conformidad
25 con las reivindicaciones de la 20 a la 28, caracterizada porque la célula huésped de la cual se deriva la preparación de vesícula de membrana externa ha sido construida para desactivar la expresión y eliminar preferentemente FrpB.

129

128

30.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 29, caracterizada porque la célula huésped de la cual se deriva la preparación de vesícula de membrana externa ha sido construida para desactivar la expresión de, y eliminar preferentemente msbB y/o HrtB, preferentemente msbB.

31.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 30, caracterizada porque la preparación de vesícula de membrana externa contiene LPS, el cual se conjuga a una proteína de membrana externa (OMP).

32.- La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque LPS se conjuga (preferentemente intra-filicena) a OMP *in situ* en la preparación de vesícula de membrana externa.

33.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 32, caracterizada porque al menos parte de la preparación de vesícula de membrana externa se deriva de *Moraxella catarrhalis*.

34.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 33, caracterizada porque al menos parte de la preparación de vesícula de membrana externa se deriva de *Haemophilus influenzae*.

35.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 34, caracterizada porque comprende una preparación de vesícula de membrana externa aislada de dos o más cepas de bacteria Gram negativa.

150

129

36.- La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque la proteína que enlaza a transferrina y la proteína similar a Hsf se activan en diferentes vesículas que se originan de diferentes cepas de bacterias o en las mismas vesículas que se originan de la misma cepa de bacterias.

37.- La preparación inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones 20 a 36, caracterizada porque comprende una preparación de vesícula de membrana externa en la cual la expresión de la proteína que enlaza a transferrina mejorada se deriva de un ácido polinucleico introducido en la bacteria Gram negativa.

38.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 37, caracterizada porque comprende una preparación de vesícula de membrana externa, en la cual la expresión de la proteína similar a Hsf mejorada se deriva de un ácido polinucleico introducido en la bacteria Gram negativa.

39.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 38, caracterizada porque comprende una preparación de vesícula de membrana externa en la cual la proteína que enlaza a transferrina mejorada y la expresión de la proteína similar Hsf se deriva de un ácido polinucleico que codifica ambas proteínas que fueron introducidas en la bacteria Gram negativa.

40.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 39, caracterizada porque la cepa bacteriana ha sido construida en forma genética para introducir una corriente ascendente de

AST

secuencia de promotor más fuerte de un gen que codifica la proteína de enlace a transferrina.

41.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 40, caracterizada porque la cepa bacteriana ha sido construida en forma genética para introducir una corriente ascendente de la secuencia promotora más fuerte de un gen que codifica la proteína similar Hsf.

42.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 41, caracterizada porque la cepa bacteriana ha sido construida en forma genética para introducir una corriente ascendente de la secuencia promotora más fuerte de genes que codifican la proteína de enlace a transferrina y la proteína similar a Hsf.

43.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 42, caracterizada porque la proteína que enlaza a transferrina es TbpA la cual es preferentemente TbpA de peso molecular alto, TbpA de peso molecular bajo o tanto TbpA de peso molecular alto como TbpA de peso molecular bajo, más preferentemente de *N. meningitidis*.

44.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 20 a la 43, caracterizada porque la proteína similar a Hsf es Hsf procedente de *Neisseria meningitidis*.

45.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 44, caracterizada porque comprende además polisacáridos u oligosacáridos capsulares bacterianos planos o conjugados.

46.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 45, caracterizada porque comprende dos o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares bacterianos conjugados a
5 proteína que enlaza transferrina o proteínas similares a Hsf o ambas.

47.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones 45 y 46, caracterizada porque el
10 polisacárido u oligosacárido capsular se deriva de una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste de *N. meningitidis* de serogrupo A, *N. meningitidis* de serogrupo C, *N. meningitidis* de serogrupo Y, *N. meningitidis* de serogrupo W-135, *Haemophilus influenzae b*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococci* Grupo A, *Streptococci* Grupo B,
15 *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

48.- Una composición inmunogénica que comprende uno o más polinucleótidos que codifican una proteína que enlaza transferrina o un fragmento antigénico de la misma, y un fragmento antigénico de proteína similar Hsf de la
20 misma, cuya expresión se conduce a través de un promotor eucariótico.

49.- La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 48, caracterizada porque se codifican TbpA y Hsf de *Neisseria*.

25 50.- La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 48 y 49, caracterizada porque se codifican TbpA y Hsf de *Neisseria meningitidis*.

51.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 50, caracterizada
30 porque comprende un adyuvante.

132

52.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicación 51, caracterizada porque comprende sales de aluminio.

53.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones 51 y 52 caracterizada porque comprende 3D-MPL.

54.- La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicación 51, caracterizada porque comprende un adyuvante que contiene CpG.

55.- Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones 1 a 54 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

56.- Un método de tratamiento o prevención de enfermedad de bacteria Gram negativa que comprende administrar una dosis protectora o una cantidad efectiva de la vacuna de conformidad con la reivindicación 55.

57.- El método de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado porque se evita o trata la infección por Neisserial.

58.- El uso de la vacuna de conformidad con la reivindicación 55 en la preparación de un medicamento para tratar o evitar la infección por bacteria Gram negativa.

59.- El uso de conformidad con la reivindicación 58 en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir la infección por Neisserial.

60.- Una cepa de bacteria Gram negativa construida en forma genética de la cual se pueden derivar vesículas de membrana dentro de la composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones 20 a 44.

A34

61.- Un método para elaborar la composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque comprende un paso de mezclar junta la proteína de enlace a transferrina aislada y la proteína similar a Hsf aislada o fragmentos antigénicos de las mismas.

62.- Un método para elaborar la composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones 20 a 44, caracterizado porque comprende un paso de aislar las vesículas de membrana externa procedentes de un cultivo de bacteria Gram negativa.

63.- El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque el paso de aislar las vesículas de membrana externa comprende la extracción con 0-0.5%, 0.02-0.4%, 0.04-0.3%, 0.06-0.2%, 0.08-0.15% o preferentemente 0.1% de detergente, preferentemente DOC.

64.- El método de conformidad con la reivindicación 47, caracterizado porque comprende el paso de conjugar polisacáridos u oligosacáridos capsulares bacterianos para proteína de enlace a transferrina y/o proteína similar a Hsf.

65.- Un método para elaborar la vacuna de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque comprende el paso de combinar la composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 54 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

66.- Un método para preparar una inmunoglobulina para utilizarse en la prevención o tratamiento de infección por Neisseria, en donde el método comprende los pasos de

Inmunizar un receptor con la vacuna de conformidad con la reivindicación 55 y aislar inmunoglobulina del receptor.

67.- Una preparación de inmunoglobulina que se puede obtener del método de conformidad con la
5 reivindicación 66.

68.- Una preparación farmacéutica que comprende la preparación de inmunoglobulina de conformidad con la reivindicación 67 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 69.- Una preparación farmacéutica que comprende anticuerpos monoclonales contra TbpA y Hsf de *Neisseria meningitidis* y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

70.- Un método de tratamiento o prevención de infección por bacteria Gram negativa que comprende el
15 paso de administrar al paciente una cantidad efectiva de la preparación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 68 y 69.

71.- El uso de una preparación farmacéutica de conformidad con las reivindicaciones 68 y 69 en la
20 fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedad por bacteria Gram negativa.

25

30

AB

135

FIGURA 1.



137

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒ [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- | | | |
|---|-------|-----|
| ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente | [x] | 1 |
| ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [x] | 1 |
| ◆ Descripción de la invención | [x] | 44 |
| ◆ Dibujos de ser estos pertinentes | [x] | 137 |
| ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas | [x] | 2 |

COMPLETA ☒ [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- | | |
|---|-----|
| ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial | [] |
| ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [] |
| ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño | [] |
| ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas | [] |

COMPLETA []

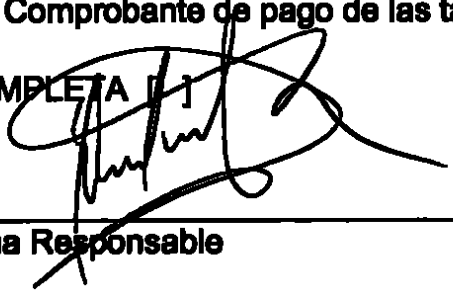
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- | | |
|---|-----|
| ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado | [] |
| ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [] |
| ◆ Representación gráfica del esquema trazado | [] |
| ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas | [] |

COMPLETA []

INCOMPLETA []



Firma Responsable

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha Radicación : 05007265 00000000

Folios: 137

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Fecha (AMD): 2005-01-28 15:39:09

Conmutador: 3 82 08 40

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INICI 411 PRESENTM

Fax: 350 52 20

Dependencia: 8020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E-mail: info@slc.gov.co

www.slc.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

Folio 139

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor(a)
ALICIA LLOREDA RICAURTE
Representante y/o Apoderado(a)
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

Oficio N° 12767

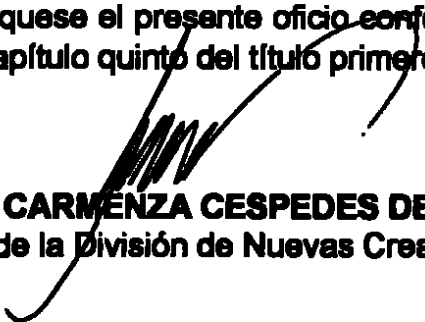
ASUNTO:	Radicación N°	05-7265
	Solicitud internacional	PCT/EP2003/008567
	Fecha inicio fase nacional	02/03/2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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

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

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

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


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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 01-ABR-2005

202027