

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-007266- -00013-0000

Fecha: 2011-01-26 16:51:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 20

Re: PI.-**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**-Solicitud de Patente de Invención Fase Nacional PCT para "**COMPOSICIONES DE VACUNA DE NEISSERIAL QUE COMPRENDEN UNA COMBINACIÓN DE ANTÍGENOS**".-CLASE **A61K 39/095**.-Expediente número **05-007.266**.-

Yo, **ALICIA LLORED A RICAURTE**, mayor de edad, vecina de ésta ciudad, abogada titulada e identificada con la cédula de ciudadanía número 39.690.713 de Usaquén, Representante Legal en Bogotá para todos los asuntos relativos a la Propiedad Industrial de la sociedad **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica, y domiciliada en Rixensart, Bélgica, atentamente manifiesto a usted que interpongo **RECURSO DE REPOSICIÓN** contra la Resolución Número **72906**, dictada por el señor Superintendente de Industria y Comercio el 24 de Diciembre de 2010 y notificada por Edicto fijado el 5 de Enero de 2011, por medio de la cual se niega el privilegio de patente solicitado para la invención contenida en el expediente de la referencia.

I. FUNDAMENTOS DE HECHO

(1) El 28 de Enero de 2005 se presentó ante la División de Nuevas Creaciones de la Superintendencia de Industria y Comercio (en adelante *SIC*), una solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT) para "**COMPOSICIONES DE VACUNA DE NEISSERIAL QUE COMPRENDEN UNA COMBINACIÓN DE ANTÍGENOS**", a nombre de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica, y domiciliada en Rixensart, Bélgica.

(2) La solicitud mencionada fue admitida a trámite por este Despacho en vista del cumplimiento de los requisitos establecidos en la ley, siéndole otorgado el número de radicación **05-007.266**.

(3) Mediante Oficio No. 12461 notificado por fijación en lista de 1 de Abril de 2005, la *SIC* emitió un auto de forma solicitando la copia del documento en el que

consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante, de acuerdo con el Artículo 26-k de la Decisión Andina 486.

(4) Mediante memorial de 19 de Abril de 2005, se allegó el documento que acredita de traspaso de los derechos de los inventores a favor del solicitante.

(5) En vista del debido cumplimiento de los requisitos formales, el extracto de la solicitud de la referencia apareció publicado en la Gaceta de la Propiedad Industrial No. 568 de fecha 29 de Septiembre de 2006, surgiendo para el solicitante la carga de solicitar la realización del examen de patentabilidad de la invención cuya protección se pretende, así como la de pagar la correspondiente tasa administrativa. El solicitante, estando dentro del término previsto, mediante memorial de fecha 26 de Diciembre de 2006 solicitó dicho examen, adjuntando el recibo de pago que acreditaba la cancelación de la tasa administrativa mencionada.

(6) Posteriormente y-en virtud del Artículo 45 de la Decisión Andina 486 de 2000, la SIC expidió el Concepto Técnico No. 4060, notificado por fijación en lista de 11 de Diciembre de 2009, mediante el cuál le fueron comunicadas al solicitante las objeciones formuladas por ese Despacho respecto del cumplimiento de los requisitos de Claridad de la Solicitud¹, Unidad de Invención², Excepciones a la Patentabilidad³, Reivindicaciones Relativas a un Uso o Segundo Uso⁴ y Novedad⁵ con base en las enseñanzas de los documento WO 01/72337 (D1) y WO 00/71725 (D2).

(7) Mediante memorial de 5 de Marzo de 2010, se solicitó un plazo de treinta (30) días para dar respuesta al auto anteriormente mencionado, adjuntando el recibo de pago que acreditaba la cancelación de la respectiva tasa administrativa.

(8) Estando dentro del término otorgado, el solicitante dio respuesta oportuna al requerimiento realizado bajo el Artículo 45 de la Decisión Andina 486 el día 23 de Abril de 2010, refiriéndose a cada una de las objeciones expuestas por ese Despacho en su Concepto Técnico No. 4060.

(9) No obstante lo anterior, y nuevamente en virtud del Artículo 45 de la Decisión Andina 486 de 2000, el día 25 de Junio de 2010, la SIC expidió el Concepto Técnico No. 1913, mediante el cuál le fueron notificadas al solicitante nuevas objeciones formuladas por ese Despacho respecto del cumplimiento de los requisitos de Claridad de la Solicitud para el capítulo reivindicatorio, Unidad de Invención y Nivel

¹ Decisión Andina 486 de 2000, Artículos 28 y 30.

² *Ibíd.*, Artículo 25

³ *Ibíd.*, Artículo 20

⁴ *Ibíd.*, Artículos 14 y 21

⁵ *Ibíd.*, Artículo 16.

Inventivo⁶, con base en las enseñanzas de los documentos WO 01/72337 (D1) ya citado y Zollinger *et al.* (D3), citado por primera vez dentro del trámite.

(10) Mediante memorial de 16 de Septiembre de 2010, se solicitó un plazo de treinta (30) días para dar respuesta al auto anteriormente mencionado, adjuntando el recibo de pago que acreditaba la cancelación de la respectiva tasa administrativa.

(11) El solicitante dio respuesta oportuna al segundo requerimiento realizado bajo el Artículo 45 de la Decisión Andina 486 el día 4 de Noviembre de 2010, refiriéndose a cada una de las objeciones expuestas por ese Despacho en su Concepto Técnico No. 1913.

(12) No obstante lo anterior, la SIC expidió la Resolución Número **72906**, dictada por el señor Superintendente de Industria y Comercio el 24 de Diciembre de 2010 y notificada por Edicto fijado el 5 de Enero de 2011, por medio de la cual se niega el privilegio de patente solicitado para la invención contenida en el expediente de la referencia, aduciendo el incumplimiento de los requisitos de Claridad para las reivindicaciones actualmente presentadas y de Nivel Inventivo en vista de las enseñanzas de los documentos WO 01/72337 (D1) y Zollinger *et al.* (D3).

Son los hechos aquí enunciados los que dan lugar al presente recurso de reposición, sustentado en los siguientes:

II. FUNDAMENTOS DE DERECHO

Como fundamento de mi recurso me permito manifestar ante ese Despacho que la expedición y el contenido de la Resolución Número **72906** se constituye en una clara violación de los Artículos 18 y 30 de la Decisión Andina 486 de 2000, toda vez que desconoce el efectivo cumplimiento de los requisitos de Claridad y Nivel Inventivo para la invención contenida en el expediente de la referencia, cuya protección se pretende en los términos de la mencionada Decisión 486 de 2000, tal y como se demostrará a continuación:

Supuesta falta de Claridad y Concisión de la materia reclamada en el capítulo reivindicatorio actualmente presentado y violación del Artículo 30 de la Decisión Andina 486:

A partir de la lectura de la Resolución No. **72906** ahora impugnada, se puede apreciar en primer lugar que para el examinador técnico a cargo del presente caso el capítulo reivindicatorio actualmente presentado no cumple con las disposiciones del Artículo 30 de la Decisión Andina 486, es decir, con los requisitos de Claridad y

⁶ *Ibíd.*, Artículo 18

Concisión, toda vez que en su opinión el alcance de protección reclamado no cuenta con un sustento adecuado en la memoria descriptiva de la solicitud, afirmando para ello que *"la restricción realizada en el capítulo reivindicatorio modificado no supera las objeciones de fondo oportunamente trasladadas, en razón a que siguen solicitándose compuestos que no demuestran el efecto técnico divulgado y los conjugados posibles no se encuentran sustentados en la descripción en forma que evidencien la actividad y la estructura"* (tercer párrafo de la página 3 de la Resolución No. **72906** aquí impugnada).

Adicionalmente, en la Resolución No. **72906** se resalta que *"tal como fue advertido en el requerimiento de fondo, en la solicitud sólo es claro que la característica técnica esencial está representada, porque la composición comprende el lipopolisacárido de L2 y/o L3 y al menos un antígeno de los mencionados"* (resaltado fuera de texto, cuarto párrafo de la página 3 de la Resolución No. **72906** aquí impugnada).

Sobre este particular, me permito manifestar a ese Despacho que para el solicitante resultan sorprendentes y contradictorias las razones expuestas anteriormente señaladas, toda vez que el capítulo reivindicatorio fue oportunamente restringido con el fin de reclamar precisamente una composición que *"comprende el lipopolisacárido de L2 y/o L3 y al menos un antígeno de los mencionados"*, tal como se puede apreciar a partir de la lectura de la reivindicación independiente 1 del capítulo reivindicatorio modificado con mi respuesta de 4 de Noviembre de 2010.

No obstante lo anterior, es decir, a pesar de que el solicitante acogió las sugerencias realizadas y restringió considerablemente el alcance de protección solicitado de acuerdo con la interpretación realizada por el examinador, en la Resolución impugnada se establece que dicha modificación no fue suficiente, **sin importar que la misma se centró en la que ha sido reconocida por esa Oficina como *"la característica técnica esencial"* de la solicitud.**

De acuerdo con lo anterior, ese Despacho podrá apreciar que la posición adoptada por el examinador en relación con las modificaciones realizadas deja sin opciones al solicitante, toda vez que a pesar haber acogido sus sugerencias y modificado de conformidad con sus requerimientos, tales limitaciones fueron sorpresivamente consideradas como insuficientes cuando existía una expectativa razonable por parte de mi representada para considerar que mediante las mismas había dado plena y suficiente respuesta a las exigencias del examinador.

Es por todo lo anterior, y teniendo como fundamento las facultades que la Decisión Andina 486 otorga al solicitante mediante las disposiciones del Artículo 34 de la misma, que de manera atenta me permito presentar ante ese Despacho un capítulo

2

reivindicatorio **que ha sido significativamente limitado** de forma tal que sea tenido en cuenta al momento de evaluar los argumentos expuestos en el presente escrito, capítulo por medio del cual se busca protección únicamente para aquella materia que corresponde a los desarrollos contenidos en los ejemplos de la descripción, así como también sobre la que el solicitante ha aportado o puede aportar información experimental adicional que demuestra el importante avance técnico que representa la invención bajo estudio.

En este sentido, me permito señalar a esa Oficina que es de interés para el solicitante dirigir el presente recurso de reposición únicamente a las reivindicaciones 1 limitada como se explicará más adelante y a las reivindicaciones actuales 2, 4, 6, 8 a 13, 29 a 48, 57, 58 y 61, renumeradas como reivindicaciones 2 a 33 en la copia anexa del capítulo reivindicatorio, de forma tal que no se pretende protección alguna para la materia de las reivindicaciones 3, 5, 7, 14 a 16, 49 a 56, 59, 60 y 62 del capítulo actualmente presentado.

En relación con la reivindicación 1, me permito dirigir la atención de esa Oficina al hecho de que la misma ha sido considerablemente limitada mediante la restricción de los significados para la adhesina Neisserial, la autotransportadora Neisserial, la proteína de adquisición de Fe Neisserial y la proteína asociada con la membrana Neisserial, **a únicamente aquellos antígenos ejemplificados para los cuales el solicitante ha proporcionado o posee datos experimentales** que demuestran el efecto técnico alegado para la composición inmunogénica que comprende cualquiera o ambos del inmutotipo L2 de LPS o el inmutotipo L3 de LPS y uno ó más antígenos diferentes. De la misma manera, el solicitante ha limitado las posibles permutaciones de dichos antígenos mediante la inclusión de la materia correspondiente a las reivindicaciones 17 a 28 dentro de la reivindicación 1 ahora restringida, señalando adicionalmente que dicha materia incluida ha sido limitada a su vez de conformidad con la evidencia experimental anteriormente mencionada.

Sobre este particular, me permito resaltar que el solicitante ha presentado y posee datos específicos concernientes a los antígenos de diferentes categorías que son ventajosamente combinados en la forma descrita por la invención, es decir, para aquellos que necesariamente deben estar presentes en la composición inmunogénica de la reivindicación 1 ahora limitada, tal como se señala a continuación:

(i) TbpA ; Hsf ; FhaB ; Hap ; FrpA/C ; LbpB ; D15/Omp85 ; PilQ ; NspA ; FrpC (en los ejemplos 16 a 20 de la descripción originalmente presentada, particularmente en el ejemplo 20);

(ii) LOS ; NspA ; Omp85 ; TbpA ; Hsf (en los datos adicionales proporcionados durante el trámite, específicamente junto con mi respuesta de 23 de Abril de 2010); y

(iii) GNA1870 (proteína de membrana exterior); GNA2132 (=lipo28) (proteína de adquisición de Fe); NadA (autotransportadora) (ver artículo de Giuliani *et al.* "**A universal vaccine for serogroup B meningococcus**" adjunto al presente escrito).

En este sentido, me permito señalar a ese Despacho que si bien en el campo del derecho de propiedad industrial es reconocido que los ejemplos de una solicitud de patente no pueden ser considerados como limitantes de la misma y que, de hecho, en la práctica esa Oficina ha aceptado la reivindicación de generalizaciones razonables respecto de la materia explícitamente ejemplificada en diversas oportunidades, la posición adoptada por el examinador a cargo del presente caso ha llevado al solicitante a restringir en forma drástica el alcance de protección pretendido, limitándolo a aquellas realizaciones particulares empleadas como ejemplos ilustrativos del efecto técnico y el aporte de la invención al estado de la técnica, razones por las cuales considero resulta procedente y ajustado a derecho aprovechar esta oportunidad procesal para solicitar se tenga en cuenta la restricción hecha sobre el alcance de la reivindicación 1 y dependientes, y en general sobre el capítulo reivindicatorio, toda vez que la misma no corresponde a una ampliación de la protección inicialmente pretendida, y así a la luz de la evaluación de los elementos ahora propuestos, conceder el privilegio de patente solicitado por mi representada para dicha materia específica.

En conexión con lo anterior, me permito dirigir la atención de esa Oficina al contenido del Artículo 34 de la Decisión Andina 486 antes mencionado, en el cual se establece al pie de la letra lo siguiente:

*"Artículo 34.- El solicitante de una patente podrá pedir que se modifique la solicitud **en cualquier momento del trámite**. La modificación no podrá implicar una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.*

Del mismo modo, se podrá pedir la corrección de cualquier error material" (énfasis añadido).

Con base en todo lo anterior, de manera respetuosa se solicita a ese Despacho que conceda el privilegio de patente para el capítulo reivindicatorio **restringido** que se adjunta al presente escrito, toda vez que el mismo corresponde **a una limitación** efectuada en concordancia con las observaciones expuestas en la Resolución No. **72906** respecto del supuesto incumplimiento del Artículo 30 de la Decisión 486.

Sobre este punto en particular, me permito señalar que la restricción realizada no implica la realización de un análisis que involucre elementos que no han sido

considerados previamente durante el trámite surtido, toda vez que al tratarse de una clara limitación respecto de materia específicamente descrita en la solicitud, corresponde entonces a un objeto que ya ha sido estudiado y considerado por el examinador, por lo que no se requiere de una nueva búsqueda de antecedentes o del estudio de elementos ajenos al proceso. Por el contrario, la materia restringida constituye un objeto tan específico y particular que ahora son aún más evidentes las diferencias con el estado de la técnica, lo que coadyuva a la evaluación final del requisito de nivel inventivo, tal como se ilustrará más adelante.

Adicionalmente, me permito señalar una vez más que la restricción anteriormente señalada está debidamente sustentada en los datos experimentales que fueron correctamente presentados de conformidad con las limitaciones realizadas en las diversas etapas del proceso y que de manera clara resultan aplicables para el alcance de protección restringido, de forma tal que se pueda proceder a revocar la resolución ahora impugnada y se pueda conceder el privilegio de patente solicitado, dado que existen elementos de juicio tanto técnicos como legales para reconocer la patentabilidad de la materia objeto de la invención bajo estudio.

Adjunto al presente escrito me permito allegar una copia del Capítulo Reivindicatorio, en el que se ha realizado la restricción descrita, capítulo que en consecuencia deberá ser tenido en cuenta por este Despacho, toda vez que mediante el mismo se pretende protección por patente sobre un objeto restringido que corresponde a la característica técnica esencial de la solicitud **tal como ha sido señalada por esa misma Oficina**, esto es, una composición inmunogénica que comprende el lipopolisacárido de L2 y/o L3 junto con al menos un antígeno adicional de acuerdo con aquellos antígenos evaluados en los ejemplos y datos experimentales aportados por el solicitante.

De otra parte, en la Resolución aquí impugnada se ha señalado que *"la objeción respecto a la claridad de las reivindicaciones 72-79, 82, 84 y 86 no fue superada debido a que las nuevas reivindicaciones equivalentes, no fueron corregidas"* (quinto párrafo de la página 3 de la Resolución N. **72906**).

Sobre este particular, me permito reiterar que tal como ha sido señalado anteriormente, ya no es de interés del solicitante el pretender protección alguna sobre la materia cubierta por dichas reivindicaciones, razón por la cual en el presente escrito no se incluyen argumentos o comentarios en relación con las mismas, toda vez que la intención de mi representada es la de lograr una concesión parcial dirigida a la materia ahora restringida, dentro de la cual no se contemplan las realizaciones de las reivindicaciones 49 a 56, 59, 60 y 62 (anteriores reivindicaciones 72-79, 82, 84 y 86).

De conformidad con lo anterior, me permito solicitar a esa Oficina tenga en cuenta el capítulo reivindicatorio **restringido** que se adjunta con el presente escrito, mediante el cual mi representada limita considerablemente el alcance de protección solicitado únicamente a aquellas composiciones inmunogénicas que tienen un sustento experimental claro y que corresponden a la característica técnica esencial que ha sido resaltada por ese Despacho, con fundamento en las facultades que el Artículo 34 de la Decisión Andina confiere al solicitante, para de esta forma cumplir con el requisito de Claridad como ha sido interpretado para la materia objeto de la invención bajo estudio por parte de esa Oficina.

Desconocimiento del Nivel Inventivo del objeto reclamado en las Reivindicaciones de la solicitud y violación del Artículo 18 de la Decisión 486 de 2000:

Tal como se desprende de la lectura de la Resolución No. **72906** ahora impugnada, el examinador técnico a cargo del presente caso no consideró en forma objetiva los argumentos presentados y las significativas limitaciones hechas por mi representada en las diversas respuestas allegadas a ese Despacho, por medio de los cuales se demostró en forma contundente que una persona versada en la materia no podría llegar en forma obvia o evidente a la composición inmunogénica particular reivindicada en la solicitud ahora denegada a partir de las enseñanzas de las referencias WO 01/72337 (D1) y Zollinger *et al.* (D2), toda vez que no solo existen diferencia técnicas significativas entre la materia revelada en dichos documentos y el objeto de la invención bajo discusión, sino que además la persona versada en la materia carecería de motivación alguna para llegar al objeto reclamado a partir de información contenida en las referencias citadas, tal como fue claramente señalado a lo largo del trámite administrativo surtido ante esa Oficina.

En relación con lo anterior, me permito dirigir la atención del Despacho a las siguientes consideraciones que permiten demostrar tanto la altura inventiva de la composición inmunogénica reivindicada en la solicitud sobre la materia descrita en los documentos D1 y D2, como el erróneo análisis de patentabilidad realizado por el examinador técnico y que, por lo tanto, no puede constituir fundamento alguno para denegar el privilegio de patente solicitado.

En relación con el documento D1, es preciso señalar a ese Despacho que dicha referencia enseña vacunas conjugadas que comprenden un antígeno de polisacárido capsular conjugado con una molécula portadora, en donde dicha molécula portadora es una proteína asociada con la ingesta de hierro por los microorganismos patogénicos.

4

En este sentido, la vacuna conjugada revelada por los autores de D1 puede comprender un segundo antígeno o antígeno adicional también conjugado con el portador, aclarando que en realizaciones preferidas dicho portador es una proteína transferrina de enlace; más en particular TbpA o TbpB. De igual manera, los inventores describen los métodos para conjuguar los antígenos con la molécula portadora y el uso de dicha proteína transferrina de enlace en la manufactura de un conjugado portador-antígeno para la vacunación.

En conexión con lo anterior, considero importante llamar ahora la atención del Despacho a la página 4 (líneas 24-32) del citado documento D1, en donde se describe la naturaleza del polisacárido capsular. Allí se expresa que:

"... Los polisacáridos capsulares son diferentes de los lipopolisacáridos y los polisacáridos derivados de los mismos. En más detalle, el término lipopolisacárido es comúnmente utilizado para referirse específicamente al componente endotóxico de la membrana externa en bacterias Gramnegativas. Los lipopolisacáridos de membrana externa son moléculas complejas que constan de tres regiones unidas covalentemente, es decir lípidoA - oligosacárido central - O - cadena específica. Así, el término lipopolisacárido describe una molécula compleja que es integral a la membrana externa de las bacterias Gramnegativas. En contraste, los polisacáridos capsulares son externos a la membrana celular del microorganismo. ..."

Por lo tanto, es evidente que dicha anterioridad **no sugiere ni motiva a la persona medianamente versada en la materia a obtener las composiciones inmunogénicas que comprenden cualquiera o ambos de los inmutipos L2 y L3 de LPS en combinación con uno o más antígenos diferentes**, toda vez que dicho documento hace una clara diferenciación entre los polisacáridos capsulares allí usados y los lipopolisacáridos que hacen parte de la materia objeto de la solicitud que se encuentra actualmente en trámite.

En vista que la anterioridad citada **no sugiere ni motiva a la persona medianamente versada en la materia a incluir ningún lipopolisacárido dentro de las composiciones inmunogénicas**, se demuestra la innegable altura inventiva de la materia objeto de la presente solicitud a la luz de la información revelada en el documento D1 y por lo tanto la misma cumple a cabalidad con lo establecido en el Artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000.

Ahora bien, en relación con el documento D2, es preciso señalar que dicha anterioridad se encuentra dirigida al uso del polisacárido capsular del subtipo B de

Neisseria Meningitidis (MenB) dentro de la composición inmunogénica allí sugerida. En este sentido, resulta importante resaltar que el uso de dicho polisacárido representa la muy conocida y ampliamente utilizada práctica de realizar una vacuna con un polisacárido capsular, en este caso de *Neisseria Meningitidis B*, toda vez que a través de dicha práctica se han obtenido vacunas efectivas para Meningitis tipo A, C, W e Y.

Sin embargo, **es necesario resaltar una vez más que dicho procedimiento no funciona para Meningitis Tipo B**, pues la semejanza entre dicho polisacárido con el humano se ve reflejada en la pobre inmunogenicidad que se alcanza al utilizar dichas vacunas.

En este orden de ideas, me permito manifestar que los autores de la anterioridad D2 citada revelan un constructo de un polisacárido capsular MenB con una Vesícula de Membrana Exterior (OMV). En este caso, es claro que si bien dentro de la vesícula de membrana exterior podría estar presente algún lipopolisacárido, también **es claro que dicha vesícula de membrana exterior es utilizada únicamente como vehículo de dicho conjugado**, es decir, como un proveedor de epítopes de células T a través de proteínas inmunodominantes no conservadas presentes sobre la superficie de la vesícula de membrana exterior.

Por lo tanto, es evidente que dicho documento no sugiere ni motiva a la persona medianamente versada en la materia a modificar la expresión (ascendente o descendente) en ninguno de los antígenos revelados en la reivindicación 1 de la presente invención, toda vez que la expresión de los genes utilizados en la referencia D2 citada **no es modificada o regulada de ninguna manera, mucho menos al interior de las vesículas de membrana exterior que en D2 sólo se utilizan como portadores**.

Sumado a lo anterior, es preciso señalar nuevamente que los autores de D2 **están enfocados en el desarrollo de una vacuna efectiva contra Meningitis B a partir de la ya conocida práctica de utilizar el polisacárido capsular MenB como antígeno principal y no a través de una combinación de diferentes antígenos que otorgue un efecto bactericida cruzado que mejore la inmunogenicidad de la vacuna**. En este sentido, es importante resaltar que dicho documento **tampoco motiva ni sugiere** a la persona medianamente versada en la materia **que las vesículas de membrana exterior (OMV) deberían ser modificadas de forma que incluyan antígenos cuya expresión haya sido regulada en forma ascendente y que sean de diferentes categorías**.

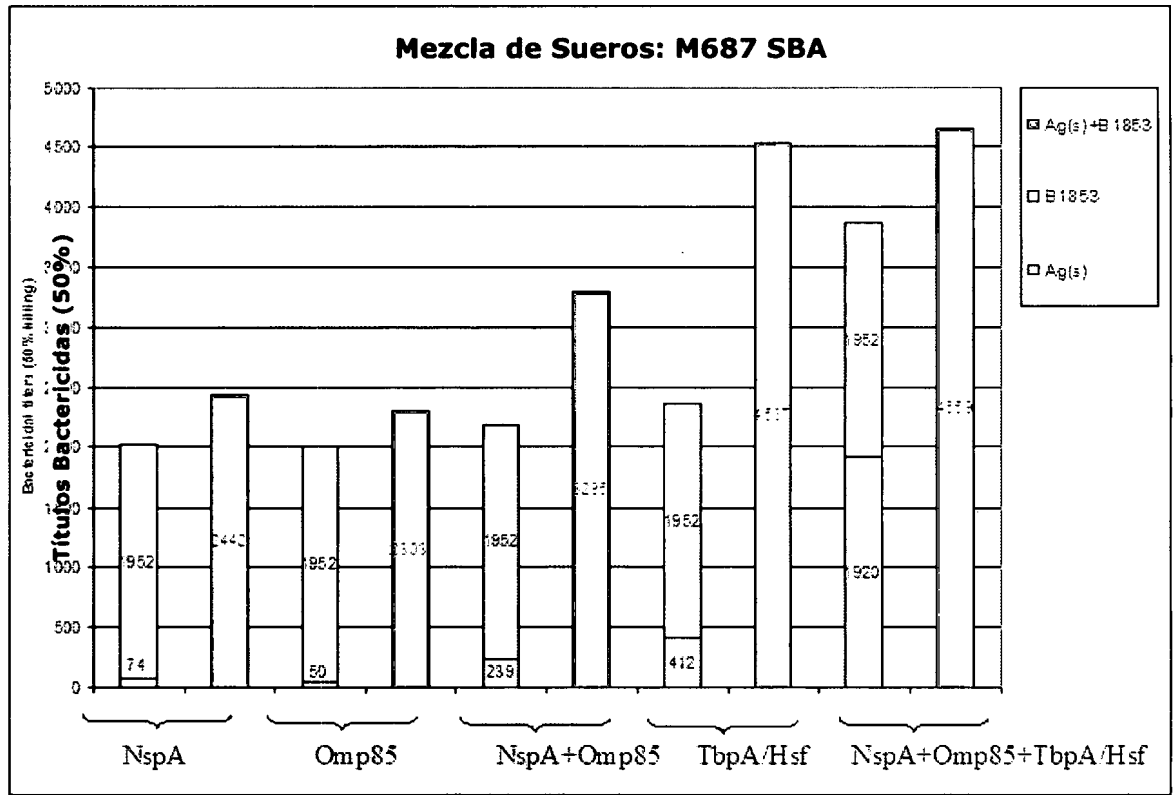
Adicionalmente, me permito señalar nuevamente que en relación con la presencia de lipopolisacáridos como los de la presente solicitud, el citado documento

5

D2 no sugiere ni motiva al técnico con conocimiento medio a combinar un lipopolisacárido con algún antígeno cuya expresión haya sido regulada en forma ascendente, tal como es necesario de conformidad con la materia objeto de la presente invención.

De conformidad con lo anterior, ese Despacho podrá apreciar que el solicitante ha demostrado que las enseñanzas de la referencia D2 tampoco pueden conducir de forma obvia o evidente a la materia objeto de la presente invención, por lo que es válido afirmar que la misma es inventiva y cumple a cabalidad con lo establecido en el Artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000.

Ahora bien, con relación al hecho que no se tiene evidencia que permita ver si la materia reivindicada presenta el efecto mencionado, me permito llamar la atención del Despacho a los datos experimentales que fueron anexados a mi respuesta de 23 de Abril de 2010, correspondiente a la siguiente información:



Los resultados revelados en la gráfica demuestran el **efecto sinérgico** que se obtiene cuando se preparan composiciones inmunogénicas que contengan combinaciones de LPS (toxina llamada también LOS) con proteínas Neisseriales que son representativas de los diferentes grupos de la presente solicitud, es decir, de la combinación de antígenos **la persona medianamente versada en la materia** **esperaría que se presentara un efecto netamente aditivo (suma de la franja amarilla y la franja blanca)** y no que la actividad inmunogénica fuera

superior a dicha suma de actividades separadas como se ilustró en la gráfica en mención (franja color naranja).

Por lo tanto, ese Despacho podrá apreciar que el solicitante si demostró en forma oportuna y a través de evidencia experimental, que la materia objeto de la presente solicitud **presenta un efecto técnico sorprendente e inesperado (sinergia) y por lo tanto la invención debe ser calificada como un claro avance y un aporte al estado de la técnica.**

De conformidad con los argumentos presentados a lo largo del trámite surtido ante ese Despacho, es evidente que la presente invención también ha demostrado que confiar en que cualquier antígeno que se encuentre en cualquier nivel normal pequeño sobre la superficie de una vesícula no es suficiente, tal como se puede apreciar a partir del Ejemplo 16 en donde se requiere de una regulación en forma ascendente para observar cualquier nivel de títulos de anticuerpo contra los antígenos involucrados. Sin la regulación en forma ascendente los antígenos simplemente **no son registrados** y por lo tanto, desde la perspectiva de una vacuna (el objeto de la presente invención) son tan buenos como si no hubiera nada allí. Todas las reivindicaciones presentadas cubren composiciones inmunogénicas y el ejemplo 16 demuestra que sin la regulación en forma ascendente cualquiera de los antígenos conservados expresados a bajo nivel del antígeno que pueda estar presente en una vesícula de tipo nativo no está presente a cualquier nivel para ser un antígeno de conformidad con la composición inmunogénica de la presente invención. De esta forma, y dada la necesidad de la regulación en forma ascendente descrita a lo largo del texto de la solicitud, es bastante claro que las vesículas de tipo nativo **no pueden anticipar o hacer obvias** las composiciones inmunogénicas ahora reivindicadas ,

El artículo adjunto a este escrito demuestra que la presente invención es realmente una observación general de que enfocarse en cualquier antígeno de cualquier grupo, o en general en las vesículas de tipo nativo, no es suficiente para obtener una vacuna de Neisserial protectora. En su lugar, 2 o preferiblemente 3 antígenos de los diferentes grupos descritos deberían ser incluidos o regulados en forma ascendente en las vesículas para obtener resultados aceptables. En este sentido, resulta importante resaltar que el artículo adjunto se encuentra dirigido a una vacuna que comprende NadA+GNA1870+GNA2132, esto es, una de las combinaciones particulares descritas por los inventores de la presente solicitud. En dicho artículo, los autores señalan en la primera columna de la página 10835 que se dio prioridad a estos tres antígenos con base en su capacidad para inducir una protección amplia, en la primera columna de la página 10836 establecen que "La potencia de la vacuna multicomponente también se demostró mediante tinción con inmuno-oro de la superficie bacteriana utilizando la vacuna de tres antígenos que provocó los mejores títulos de BCA (Tabla 1). Los anticuerpos contra GNA2132,

6

GNA1870, y NadA tiñeron la superficie de la cepa BZ83 de MenB con diferente densidad (Fig. 2 a-c). Sin embargo, la tinción desarrollada con antisuero generado contra la vacuna (Fig. 2d) incrementó grandemente la densidad de partículas de oro hasta un nivel que fue comparable con uno obtenido utilizando anticuerpos contra MC58 PorA (Fig. 2e), que es conocida por conferir protección en humanos", y en la primera columna de la página 10838 "Si los resultados aquí reportados son confirmados en ensayos clínicos, es posible que esta vacuna conquiste una de las enfermedades más devastadoras que sigue causando morbilidad y mortalidad en niños y adolescentes".

De conformidad con lo anterior, ese Despacho podrá apreciar que existe evidencia que demuestra que los antígenos incluidos en una composición inmunogénica tal como la descrita y reivindicada por los inventores están trabajando juntos para lograr un resultado significativamente mejorado. Por lo tanto, no son únicamente los inventores de la presente solicitud los que reconocen el valor de la materia comprendida y revelada por primera vez en la invención bajo estudio para el campo técnico de la vacunación contra Neisserial, un campo en que no ha habido un prospecto de vacuna por muchas décadas antes de la invención, sino que también son otros autores y grupos de investigación en el mismo campo los que reconocen el considerable avance y aporte de materia como la reivindicada al estado de la técnica.

Por lo tanto, no puede mantenerse la posición de que el alcance de la invención excede lo que ha sido claramente demostrado por el solicitante mediante los datos experimentales previamente proporcionados y los ahora aportados, que confirman el efecto técnico alegado de la invención bajo estudio, así como la importancia que este desarrollo tiene dentro del campo de la vacunación.

Ahora bien, en términos de la evaluación del nivel inventivo, me permito señalar que tal como ha sido demostrado a lo largo del presente trámite, ninguno de los documentos citados describe cualquiera de las combinaciones específicas de LOS y antígenos de la reivindicación 1 de la presente invención, mucho menos de la reivindicación que ha sido ahora restringida de conformidad con los datos experimentales aportados.

En particular, el documento D2 describe el uso del sacárido capsular de MenB y no existe allí ninguna motivación para mezclar diferentes clases de antígenos para alcanzar los beneficios de una composición inmunogénica como la reivindicada. Nuevamente, el ejemplo 16 de la presente solicitud demuestra que los OMV de MenB a partir de cepas de tipo nativo no pueden producir las composiciones inmunogénicas ventajosas de la presente invención, toda vez que se necesita de la regulación en forma ascendente de los antígenos seleccionados para llegar al efecto mejorado demostrado experimentalmente. En este sentido, en ausencia de cualquier sugerencia

o motivación para incorporar dentro de las composiciones de D1 y D2 los antígenos de proteína específicamente reivindicados, no puede ser considerado como obvio o evidente la incorporación de antígenos regulados en forma ascendente en una vesícula de membrana exterior tal como ha sido revelado por mi representada para así conseguir los sorprendentes y ventajosos resultados descritos en los datos proporcionados a esa Oficina.

Finalmente, de manera respetuosa me permito manifestar que para el solicitante no resulta aceptable que se emplee como argumento para sustentar una supuesta falta de nivel inventivo la simple afirmación de qué es lo que está y no está presente en una OMV ya conocida. En relación con dicha apreciación del examinador, me permito señalar que no hay forma de que la persona versada en la materia pudiera saber o comprender en forma obvia o evidente qué niveles de cuáles antígenos están presentes, así como tampoco si cualquiera de los antígenos podría mantenerse durante el riguroso paso de procesamiento involucrado en la extracción de las OMV (a menudo extracción con detergente que remueve muchas proteínas de la OMV tales como las lipoproteínas Lipo28 y GNA1870). Dado que la objeción es por falta de nivel inventivo (y no por falta de novedad), no puede afirmarse correctamente que una persona versada en la materia podría pensar que es obvio mantener cualquiera de los antígenos señalados en las reivindicaciones sobre la superficie de la vesícula descrita en D1 o D2 no obstante la clara ausencia de cualquier motivación o sugerencia adicional acerca de cuáles antígenos deberían ser mantenidos.

Por lo tanto, en ausencia de esta y cualquier otra información en los documentos citados acerca de los antígenos específicos involucrados en la composición inmunogénica reivindicada, así como también de la necesidad de que los mismos sean regulados en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior, y considerando adicionalmente la evidencia experimental que demuestra que las vesículas de tipo nativo de D1 y D2 no satisfacen los requerimientos de la presente invención de acuerdo con el ejemplo 16, ese Despacho podrá apreciar sin dificultad que no existen elementos de carácter técnico que permitan sustentar correctamente una supuesta falta al requisito de nivel inventivo, sobre todo al considerar el contexto técnico del campo en el cual se desarrolla la invención.

De acuerdo con lo anterior, es preciso señalar como ya se ha mencionado previamente, que **la persona medianamente versada en la materia no podría deducir de forma obvia o evidente a partir de la información revelada en la referencia D1, la presencia de cualquiera o incluso ambos inmutipos L2 y L3 en composiciones de vacunas Neisseriales que comprendan uno o más antígenos diferentes.**

De igual manera, es evidente que el documento D1 está enfocado hacia el desarrollo de composiciones **que comprenden polisacáridos capsulares y no lipopolisacáridos**, por lo tanto la persona con conocimientos medios no podría llegar de forma evidente a la materia de la solicitud bajo discusión a partir de la información revelada en D1.

De manera similar, con relación con la referencia D2 es preciso llamar la atención de ese Despacho al hecho que **las enseñanzas de dicho documento no sugieren ni motivan al versado en la materia a incluir lipopolisacáridos dentro de composiciones inmunogénicas**. Por el contrario, dicha anterioridad resalta la utilidad de los polisacáridos capsulares en la formulación de composiciones de vacunas contra meningitis tipo B.

Sumado a lo anterior, también es claro que **D2 es completamente silencioso con respecto a la regulación de la expresión de los antígenos, por lo tanto la persona con conocimientos medios no tendría motivación para regular en forma ascendente la expresión de los antígenos** utilizados en la formulación de las vacunas de la presente invención.

Finalmente, es preciso considerar que las enseñanzas del documento D2 consideran el uso de Vesículas de Membrana Exterior **únicamente como portador para facilitar el transporte del conjugado de polisacárido capsular y no sugiere ni motiva la incorporación a dichas vesículas, de otros antígenos conservados que mejoren la actividad bactericida de las composiciones inmunogénicas, mucho menos de los antígenos específicos revelados en la invención bajo estudio**.

En vista de todo lo anterior, cabe aquí preguntarse **que motivaría a la persona medianamente versada en la materia a tomar las enseñanzas de las referencias D1 y D2 citadas con la finalidad de obtener una composición inmunogénica** que:

- (i) contenga por lo menos dos tipos de antígenos Neisseriales diferentes,
- (ii) que contenga al menos uno o ambos de los inmunotipos L2 o L3 de LPS (lipopolisacáridos), y
- (iii) que la expresión de dichos antígenos sea regulada de forma ascendente al interior de Vesículas de Membrana Exterior (OMV)

Sobre todo cuando, tal como se demostró en forma contundente a lo largo del presente proceso, **D1 está enfocado al uso de proteínas de absorción de Hierro**

como proteínas transportadoras de conjugados que comprenden polisacáridos capsulares y D2 utiliza las vesículas de membrana exterior (OMV) únicamente como portador para los conjugados de polisacáridos capsulares de MenB.

Así las cosas, es preciso señalar que si la persona medianamente versada en la materia combinara las enseñanzas de las referencias D1 y D2 **sería para sustituir las Vesículas de Membrana Exterior (OMV) que actúan como portadores del conjugado del polisacárido capsular por las proteínas de absorción de Hierro que sugiere claramente la anterioridad D1.** Por lo tanto, la solicitud es inventiva incluso a la luz de la combinación de las enseñanzas de los documentos D1 y D2.

Ahora bien, a la luz de estos hechos me permito dirigir la atención de esa Oficina a las consideraciones expuestas por la Secretaría General de la Comunidad Andina en el Manual Andino de Patentes, relevante publicación que reconocemos no es de carácter vinculante para el Despacho pero que corresponde a una importante referencia en tanto que allí se expresa el sentir de la Secretaría General respecto de la evaluación de patentabilidad que deben realizar los examinadores de patentes de las diversas oficinas de patentes de los países miembros de la Comunidad Andina, en donde se manifiesta lo siguiente en relación con el análisis del requisito de Nivel Inventivo de una solicitud:

"... a) *¿Cuándo un compuesto químico o composición química tienen nivel inventivo?*

- *el compuesto tiene una estructura inesperada (caso poco frecuente); ó,*
- ***presenta un efecto inesperado, (es el caso más frecuente sobre todo si el compuesto es similar a otros del estado de la técnica. El efecto inesperado puede ser completamente diferente de los descritos para los compuestos similares conocidos, o bien ser igual pero con una mejora en los resultados).*** ..."⁷ (resaltado fuera del texto)

De conformidad con lo anterior, se puede afirmar sin lugar a dudas que:

(a) No es posible de ninguna forma para la persona medianamente versada en la materia, derivar de forma obvia la composición inmunogénica objeto de la invención denegada a partir de las enseñanzas de los documentos D1 y D2, que repetimos no solo revelan composiciones de vacuna que carecen de los elementos esenciales de la composición de la solicitud, sino que además carecen de sugerencias que pudieran conducir a la persona versada a considerar tales elementos; y

⁷ Ibid Página 4, Ver p. 82

(b) A través de los diferentes datos experimentales aportados por el solicitante, se ha **demostrado el sorprendente e inesperado aporte técnico de la composición inmunogénica de la invención en cuanto al efecto bactericida mejorado que se puede alcanzar gracias a la combinación de antígenos desarrollada por el solicitante.**

Por lo tanto, se ha demostrado no solo que a lo largo del trámite surtido el solicitante proporcionó argumentos claros y técnicamente bien fundamentados para confirmar la altura inventiva de la solicitud rechazada, sino además que en la Resolución ahora impugnada se ha tomado la decisión de negar el privilegio de patente solicitado con base en argumentos sin fundamento técnico y que corresponden a una interpretación errónea y en retrospectiva de la información técnica proporcionada por D1 y D2 que no es de recibo como parte de un análisis de patentabilidad realmente objetivo.

En consecuencia, **la composición inmunogénica objeto de la presente solicitud posee la altura inventiva requerida respecto de las enseñanzas de los documentos D1 y D2, y cumple a cabalidad con lo establecido en el Artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000.**

III. CONCLUSIONES

1. La expedición y en si mismo el contenido de la Resolución Número **72906**, dictada por el señor Superintendente de Industria y Comercio el 24 de Diciembre de 2010 y notificada por Edicto fijado el 5 de Enero de 2011, por medio de la cual se niega el privilegio de patente para el objeto de la invención de la referencia, se erige como una clara e indiscutible violación a los Artículos 18 y 30 de la Decisión Andina 486 de 2000, toda vez que la materia objeto de la invención rechazada cumple a cabalidad con los requisitos de Claridad y Nivel Inventivo, tal como se ha demostrado a través de los argumentos anteriormente presentados.

2. En efecto, en atención a los argumentos tanto jurídicos como técnicos presentes en este escrito, es completamente claro que el objeto de la solicitud tal como ha sido limitado sí cumple con el requisito de Claridad del Artículo 30, toda vez que corresponde a materia que tiene un claro sustento tanto en la memoria descriptiva como en los datos experimentales aportados por el solicitante.

3. De igual manera, el objeto reclamado tal como ha sido limitado también cumple con el requisito de Nivel Inventivo exigido en el Artículo 18 de la Decisión 486 de 2000, toda vez que los documentos citados como estado de la técnica más cercano son completamente silenciosos respecto de las características técnicas particulares que presenta la composición inmunogénica reivindicada por el solicitante, así como

tampoco contienen enseñanzas que pudieran sugerir o motivar a la persona versada en la materia a considerar tales características técnicas específicas, por lo que no pueden afectar la altura inventiva de un objeto como el reclamado en la invención denegada.

4. En consecuencia, se ha demostrado en forma clara y contundente que una persona versada en la materia, interesada en proporcionar composiciones inmunopénicas con actividad bactericida mejorada frente a enfermedades causadas por Neisseria, no encontraría en los documentos citados sugerencia alguna que le permitiera llegar a dicho resultado, así como tampoco podría anticipar que efectivamente es la combinación de las características técnicas desarrollada por el solicitante la que conduce a un efecto mejorado que sin lugar a dudas resulta sorprendente y completamente inesperado para una persona versada en la materia que tome como base las enseñanzas de tales documentos.

Por lo tanto, y en aras de restablecer los derechos vulnerados al solicitante, tal y como fue explicado a lo largo del presente escrito, atentamente solicito a ese Despacho considerar los argumentos expuestos anteriormente y revocar en su totalidad la Resolución Número 72906.

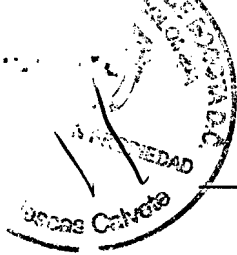
IV. PODER

Finalmente me permito recordarle a este Despacho que el documento que acredita mi calidad de representante legal en Bogotá para asuntos relativos a la Propiedad Industrial de la sociedad peticionaria, fue presentado ante dicha entidad con mi solicitud de patente de 28 de Enero de 2005.

V. ANEXOS

Adjunto me permito presentar:

- (i) Copia de las páginas 147 a 153 que corresponden al capítulo reivindicatorio limitado tal como fue anteriormente expuesto; y
- (ii) Copia informal del artículo "***A universal vaccine for serogroup B meningococcus***" de Giuliani *et al.*, en *PNAS*, Vol. 103, No. 29, páginas 10834 – 10839, Julio 18 de 2006.



JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

VI. DOMICILIO

Mi dirección es Calle 72 No. 5-83, Piso 6º., Bogotá D.C., Colombia.

Del Señor Superintendente,

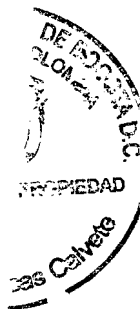
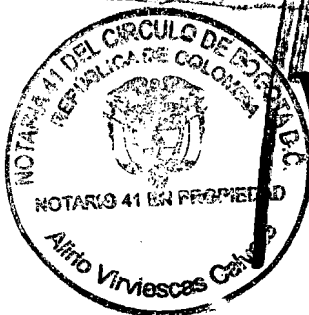
ALICIA LLORED A RICAURTE

T.P. 53.215

NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPÚBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente: Alicia Lloreda Ricaurte
identificada (c) con: 39.690.713 y tarjeta
profesional de abogado No. 53215 del Consejo
Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella
(c) mismo en este escrito.
(Art. 84 C. P. C. Decreto. 2282/89 mod. 36)

26 ENE 2011
ALICIA LLORED A RICAURTE
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén



REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende cualquiera o ambos del inmunotipo L2 de LPS o el inmunotipo L3 de LPS y uno ó más antígenos diferentes, en donde los antígenos se seleccionan de por lo menos una de las siguientes categorías:

a) por lo menos una adhesina Neisserial, en donde la adhesina Neisserial es seleccionada del grupo que consiste de FhaB, NspA, Hsf, Hap y NadA;

b) por lo menos una autotransportadora Neisserial, en donde la autotransportadora Neisserial es seleccionada del grupo que consiste de Hsf, Hap, y NadA;

c) por lo menos una proteína de adquisición de Fe Neisserial, en donde la proteína de adquisición de Fe Neisserial seleccionada del grupo que consiste de TbpA, LbpB y Lipo 28; o

d) por lo menos una proteína asociada con la membrana Neisserial, en donde la proteína asociada con la membrana Neisserial es seleccionada del grupo que consiste de PilQ, Omp85, NspA y GNA1870, preferiblemente proteína de membrana exterior integral.

en donde los antígenos, cuando están presentes en una vesícula de membrana exterior, han sido regulados en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior;

y en donde:

FhaB se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: Hsf, LbpB, FrpC, FrpA/C, NadA, OMP85, TbpA, Hap, PilQ, GNA1870, NspA y Lipo28;

y/o NspA se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: Hsf, LbpB, FrpC, FrpA/C, NadA, OMP85, TbpA, Hap, PilQ, GNA1870 y Lipo28;

y/o NadA se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: Hsf, LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA, Hap, PilQ, GNA1870 y Lipo28;

y/o TbpA se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: Hsf, LbpB, FrpC, FrpA/C, OMP85, TbpA, Hap, PilQ, GNA1870 y Lipo28;

y/o OMP85 se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: Hsf, FrpC, FrpA/C, Hap, PilQ, GNA1870 y Lipo28;

y/o Hap se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: Hsf, FrpC, FrpA/C, PilQ, GNA1870 y Lipo28;

y/o Hsf se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: FrpC, FrpA/C, PilQ, GNA1870 y Lipo28;

y/o FrpC se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de: PilQ, GNA1870 y Lipo28; y

y/o GNA1870 se selecciona junto con por lo menos un antígeno adicional seleccionado del grupo que consiste de Lipo28

2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, la cual es una composición de subunidad.
3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una preparación de vesícula de membrana exterior, en donde los antígenos han sido regulados en forma ascendente (preferiblemente recombinantemente) en la vesícula de membrana exterior.
4. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una composición de subunidad que tiene uno o más de los antígenos, y una preparación de vesícula de membrana exterior que tiene por lo menos un antígeno, el cual ha sido regulado en forma ascendente en la vesícula de membrana exterior.
5. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 3 y 4, que comprende por lo menos dos preparaciones diferentes de vesícula de membrana exterior de la reivindicación 3.
6. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la preparación de la vesícula de membrana exterior es del inmunotipo L2, y una preparación de la vesícula de membrana exterior es del inmunotipo L3.
7. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 3-6, en donde se selecciona NspA.

8. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 3-6, en donde se selecciona Omp85.
9. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 3-6, en donde se seleccionan Hsf y TbpA (alto).
10. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 3-6, en donde se seleccionan Hsf y TbpA (bajo).
11. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 3-10, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de uno o más de IgtB o IgtE, preferiblemente el primero.
12. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 3-11, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior es incapaz de sintetizar el polisacárido capsular, y ha sido preferiblemente diseñada para así regular de manera descendente la expresión de uno o más de SiaD, crtA, ctrB, ctrC, ctrD, synA (equivalente a synX y SiaA) o synB (equivalente de SiaB) y synC (equivalente de siaC), preferiblemente SiaD.
13. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 3-12, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de uno o más de OpC, OpA o PorA, preferiblemente PorA.
14. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 3-13, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de

membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de FrpB.

15. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 3-14, en donde una célula huésped a partir de la cual se deriva la preparación de la vesícula de membrana exterior ha sido diseñada para así regular de manera descendente la expresión de msbB y/o hrtB, preferiblemente msbB.

16. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-15, que comprende un antígeno derivado de *Neisseria meningitidis*, preferiblemente el serogrupo B.

17. Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con las reivindicaciones 1-16, que comprende un antígeno derivado de *Neisseria gonorrhoeae*.

18. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-17, en donde todos los antígenos neisserial se derivan de *N. meningitidis*, preferiblemente del serogrupo B.

19. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-18, que además comprende uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares bacterianos.

20. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, en donde los polisacáridos u oligosacáridos capsulares se derivan de bacterias seleccionadas del grupo que consiste de: serogrupo A, C, Y y W-135 de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, Grupo A de *Streptococci*, Grupo B de *Streptococci*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

21. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19 o 20, en donde el polisacárido u oligosacárido capsular está conjugado a una proteína.
22. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-21, que comprende un auxiliar.
23. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 22, que comprende sales de aluminio, preferiblemente fosfato de aluminio.
24. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, que comprende 3D-MPL.
25. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-24, y un portador farmacéuticamente aceptable.
26. Un método para hacer la composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-24, que comprende un paso de mezclar juntos por lo menos dos antígenos de Neisseria.
27. Un método para hacer la composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 3-24, que comprende un paso de aislar las vesículas de membrana exterior de un cultivo Neisserial.
28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, que comprende un paso adicional de combinar por lo menos dos preparaciones de vesícula de membrana exterior.

29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en donde por lo menos una preparación de vesícula de membrana exterior contiene LPS del inmunotipo L2 y por lo menos una preparación de vesícula de membrana exterior contiene LPS del inmunotipo L3.

30. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 3-24, que comprende una ampolla meningocócica del inmunotipo L2 y una ampolla meningocócica del inmunotipo L3.

31. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 30, en donde las ampollas son aisladas de cepas meningocócicas incapaces de hacer polisacárido capsular, preferiblemente siaD⁻.

32. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 30 y 31, en donde las estructuras de oligosacárido de LPS de L2 y/o L3 están truncadas consistentes con las ampollas que han sido aisladas de las cepas meningocócicas que son lgtB⁻.

33. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde los antígenos se han regulado de manera ascendente en la vesícula de membrana exterior a través del crecimiento de una cepa madre de *Neisseria* bajo condiciones limitadas de Hierro.

A universal vaccine for serogroup B meningococcus

Marzia M. Giuliani*, Jeannette Adu-Bobie*, Maurizio Comanducci*, Beatrice Aricò*, Silvana Savino*, Laura Santini*, Brunella Brunelli*, Stefania Bambini*, Alessia Biolchi*, Barbara Capecchi*, Elena Cartocci*, Laura Ciocchi*, Federica Di Marcello*, Francesca Ferlicca*, Barbara Galli*, Enrico Luzzi*, Vega Massignani*, Davide Serruto*, Daniele Veggi*, Mario Contorni*, Maurizio Morandi*, Alessandro Bartalesi*, Vanda Cinotti*, Donatella Mannucci*, Francesca Titta*, Elisa Ovidi*, Jo Anne Welsch*, Dan Granoff[‡], Rino Rappuoli*[§], and Mariagrazia Pizza*

*Novartis Vaccines, Via Fiorentina 1, 53100 Siena, Italy; [†]Centro Interdipartimentale di Microscopia Elettronica, University of Tuscia, 01100 Viterbo, Italy; and [‡]Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, CA 94609

This contribution is part of the special series of Inaugural Articles by members of the National Academy of Sciences elected on May 3, 2005.

Contributed by Rino Rappuoli, May 12, 2006

Meningitis and sepsis caused by serogroup B meningococcus are two severe diseases that still cause significant mortality. To date there is no universal vaccine that prevents these diseases. In this work, five antigens discovered by reverse vaccinology were expressed in a form suitable for large-scale manufacturing and formulated with adjuvants suitable for human use. The vaccine adjuvanted by aluminum hydroxide induced bactericidal antibodies in mice against 78% of a panel of 85 meningococcal strains representative of the global population diversity. The strain coverage could be increased to 90% and above by the addition of CpG oligonucleotides or by using MF59 as adjuvant. The vaccine has the potential to conquer one of the most devastating diseases of childhood.

meningococcus B | reverse vaccinology

Neisseria meningitidis is an encapsulated, Gram-negative bacterium that colonizes the upper respiratory tract of ~10% of humans. With a frequency of one to three cases per 100,000 of the population, the bacterium enters the bloodstream, where it multiplies to high density and causes a form of sepsis characterized by the dramatic disruption of the endothelium and microvasculature. From the bloodstream the bacterium can cross the blood-brain barrier and cause meningitis. The invasive infection is very dramatic, affecting mostly infants, children, and adolescents who do not have bactericidal antibodies to the infecting strain. Within a few hours otherwise healthy subjects become severely sick, and, despite the sophistication of modern medicine and availability of effective antibiotics, 5–15% die, and up to 25% of the survivors have lifelong sequelae. During epidemics the frequency of disease increases to >10/100,000 of the population and rises to as high as 400/100,000. Based on the chemical composition of the polysaccharide capsule, *N. meningitidis* strains can be classified into 13 different serogroups. Strains representative of five serogroups (A, B, C, Y, and W135) cause nearly all disease in humans (1, 2).

Most of the strains isolated from invasive meningococcal disease have also been classified by multilocus enzyme electrophoresis (3) into several hypervirulent lineages (electrophoretic types: ET37, ET5, cluster A4, lineage 3, and subgroups I, III, and IV-1) or by multilocus sequence typing (4) into sequence type (ST) complexes (cpx) ST11, ST32, ST8, ST41/44, ST1, ST5, and ST4.

N. meningitidis causes ~1.2 million cases per year globally, of which 3,000 occur in the United States and 7,000 occur in Europe, where the organism remains the most common cause of bacterial meningitis in children and young adults (5). Serogroup B meningococcus (MenB) is responsible for ~32% of meningococcal disease reported in the United States, and from 45% to >80% of meningococcal disease reported in Europe (6, 7). Immunity against the disease can be acquired naturally or induced by vaccination and correlates with the presence of

bactericidal antibodies, which kill the bacterium in the presence of complement (8). Tetravalent vaccines composed of the purified capsular polysaccharides of serogroups A, C, Y, and W135 have been available for three decades for use in adults. Conjugate vaccines, effective in all age groups, were developed a decade ago (9). Large-scale vaccination against serogroup C meningococcus in the United Kingdom in the year 2000 showed that these vaccines are very safe and effective in eliminating the disease (10) and led to the licensure of tetravalent conjugate vaccines against serotypes A, C, Y, and W-135. Once universally deployed, these vaccines will likely eliminate forever the disease caused by strains with these serogroups.

MenB differs from the others because it is decorated by a capsular polysaccharide identical to the polysialic acid [α (2–8) *N*-acetylneuraminic acid] present in many human glycoproteins. This mimicry rules out the use of polysaccharide–protein conjugate vaccines as an effective strategy to combat MenB disease. Therefore, currently there is no universal vaccine available against this bacterium. Protein-based vaccines composed of outer membrane vesicles (OMV) purified from the bacterium have been produced; however, they induce immunity mostly against the highly variable PorA membrane protein, and efficacy trials have shown serosubtype-specific protection (11). To develop a universal vaccine against MenB, a few years ago we determined the sequence of the genome of the bacterium and used it to discover novel antigens (12, 13). Thus, MenB became the prototype for the use of genomics for vaccine development, a process termed reverse vaccinology (14).

Twenty-eight novel antigens that were able to induce antibodies with bactericidal activity (BCA) in mice when used for immunization using Freund's complete adjuvant (FCA) were identified. Some of the antigens had a high degree of sequence conservation using a historical panel of MenB strains and were recognized by sera of patients convalescent from meningococcal disease (15, 16). Detailed studies on some of the most promising antigens confirmed that some of these antigens were good candidates for a universal vaccine (16, 17), whereas others turned out to be less interesting. For instance, GNA33 was found to be a mimotope of PorA and thus unlikely to be useful as a vaccine because of serosubtype specificity (18).

However, although the *in vitro* antibody data obtained in mice immunized with the individual antigens in FCA were encour-

Conflict of interest statement: All authors either are employed by or have an ongoing collaboration with Novartis Vaccines.

Freely available online through the PNAS open access option.

Abbreviations: ET, electrophoretic type; ST, sequence type; MenB, serogroup B meningococcus; OMV, outer membrane vesicle(s); BCA, bactericidal activity; cpx, complex; FCA, Freund's complete adjuvant.

See accompanying Profile on page 10831.

[§]To whom correspondence should be addressed. E-mail: rino.rappuoli@chiron.com.

© 2006 by The National Academy of Sciences of the USA

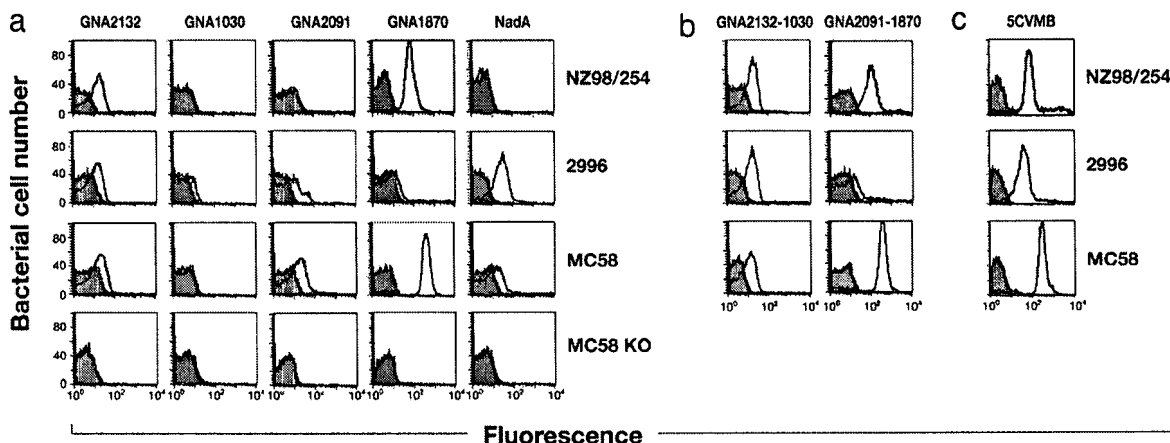


Fig. 1. FACS analysis of *N. meningitidis* strains using sera prepared against vaccine antigens. (a) Binding of polyclonal antiserum raised against the individual antigens GNA2132, GNA1030, GNA2091, GNA1870, and NadA (left to right) to live encapsulated MenB strains NZ98/254 (first row), 2996 (second row), and MC58 (third row). The fourth row contains the MC58 knockout mutants (KO) of each antigen probed with the homologous antiserum. Red profiles represent the negative control (preimmune sera). White profiles show reaction with immune sera. (b and c) Binding of polyclonal antibodies against fusion proteins (b) and 5CMB vaccine (c). First row, NZ98/254 (B:4:P1.4), ST cpx 41/44, ET lin.3, *nadA*[−]. Second row, 2996 (B:2b:P1.5.2), ST cpx 8, ET A4. Third row, MC58 (B:15:P1.7,16b), ST cpx 32, ET ET5.

aging, it was not clear whether the responses were sufficient for the development of a vaccine suitable for human use and able to induce universal protection against recent, genetically diverse, and epidemiologically relevant clinical isolates.

Results

Antigen Selection. The antigens selected by reverse vaccinology were prioritized based on their ability to induce broad protection as inferred by BCA or observed in passive protection in the infant rat or mouse protection assays (19, 20). The three top antigens that met the prioritization criteria were GNA2132 (21), GNA1870 (16, 22, 23), and NadA (17, 24). Two additional antigens, GNA1030 and GNA2091 (13), were selected because they also induced protective immunity but only in some of the assays. FACS analysis (Fig. 1a) showed that the sera obtained from mice immunized with each of the five antigens formulated with aluminum hydroxide stained the surface of one or more of the MenB strains NZ98/254, 2996, and MC58, which were selected as representative of the most common patterns observed among a variety of different strains. The serum against GNA1030, which appears only slightly positive in the figure, showed positive binding to 2996 when the serum used had been obtained by immunizing with complete FCA instead of aluminum (data not shown). The figure also shows that none of the antisera prepared against the individual antigens stained all of the strains well. To confirm the specificity of the analysis, none of the sera stained the MC58 knockout mutants where the corresponding gene had been deleted (Fig. 1a, MC58 KO). Binding activity observed in FACS paralleled antibody functional activity observed in the BCA assay (Table 1). The presence of BCA was tested in sera obtained by immunizing mice with each of the antigens formulated with aluminum hydroxide or FCA (Table 1). With the exception of GNA2091, which, although unable to induce BCA, had been selected for its ability to induce protection in the mouse protection assay (19, 20) (data not shown), each of the other individual antigens induced BCA against one or more of the three strains. The proteins GNA2132, GNA1030, and GNA1870 induced better titers when formulated with FCA than when formulated with aluminum. In the case of NadA, the two adjuvants gave a similar titer.

Although the five antigens had been selected based on their individual behavior, none of them induced protective antibody

responses that were sufficiently broad enough to cover all strains tested.

A Combination of Antigens to Develop an Effective Serogroup B Vaccine. Given that vaccines containing several antigens have been shown to confer better protection than those containing only one or two antigens (25), we combined the five antigens into one multicomponent vaccine, trusting that this would increase the breadth of the vaccine coverage and avoid selection of escape mutants. To facilitate large-scale industrial manufacturing of the vaccine, four of the five antigens were expressed as fusion proteins. Among >30 protein–protein fusions generated, the most promising were the combinations of GNA2132 with GNA1030 and of GNA2091 with GNA1870. NadA did not perform well when fused to other proteins, probably because of the loss of the trimeric organization (data not shown) (24, 26). The two fusion proteins formulated with aluminum hydroxide induced immune responses in both FACS (Fig. 1b) and BCA assays (Table 1) that were generally more potent than those induced by the individual antigens. Twenty micrograms of each of the two fusion proteins and of the NadA antigen was adsorbed to aluminum hydroxide to make the

Table 1. Bactericidal activity of mice polyclonal antibodies

Immunogens	Strains					
	MC58		2996		NZ98/254	
	FCA	Al(OH) ₃	FCA	Al(OH) ₃	FCA	Al(OH) ₃
Antigens						
GNA2132	16,384*	512	16,384	1,024	16,384	512
GNA1030	<4	<4	2,048	<4	<4	8
GNA2091	<4	<4	<4	<4	<4	<4
GNA1870	65,536	16,384	64	<4	16,384	64
NadA	512	1,024	4,096	4,096	<4	<4
Fusions						
GNA2132–1030	n.d.	2,048	n.d.	2,048	n.d.	4,096
GNA2091–1870	n.d.	32,768	n.d.	<4	n.d.	1,024
Vaccine						
5CMB	65,536	32,768	8,192	4,096	16,384	4,096

*Bactericidal titers were expressed as the reciprocal of the serum dilution yielding ≥50% bactericidal killing. n.d., not determined.

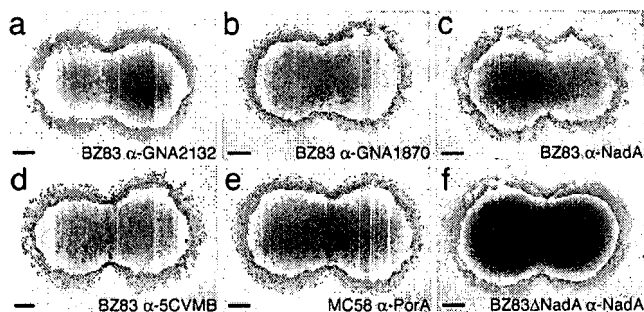


Fig. 2. ImmunoGold labeling and transmission electron microscopy. Analysis of BZ83 strain was performed with antisera raised against vaccine antigens: anti-GNA2132 (a), anti-GNA1870 (b), anti-NadA (c), and anti-5CVMB (d) vaccine. (e) Anti-PorA staining of strain MC58 performed by using a mAb raised against PorA 1.7. (f) Representative control showing anti-NadA staining of strain BZ83 mutant knockout for the *nadA* gene (BZ83ΔNadA). Similar results were obtained when knockout strains in *gna2132* and *gna1870* genes were analyzed with the corresponding antisera (data not shown). (Scale bars: 200 nm.)

vaccine formulation that was used in subsequent studies. We named the multicomponent vaccine 5CVMB (5 component vaccine against MenB). In FACS analysis (Fig. 1c) the antibodies obtained by immunizing with this vaccine stained the three representative MenB strains very well. Similarly, the antibodies had BCA titers against each of the three strains, ranging from 4,096 to 32,768 (Table 1). The respective titers were only slightly lower than those obtained by immunizing with FCA, which is the most potent adjuvant known for mouse immunization but is unsuitable for human use.

The potency of the multicomponent vaccine was also demonstrated by ImmunoGold staining of the bacterial surface using the three vaccine antigens that elicited the best BCA titers (Table 1). The antibodies against GNA2132, GNA1870, and NadA stained the surface of MenB strain BZ83 with different density (Fig. 2a–c). However, the staining performed with antisera raised against the vaccine (Fig. 2d) greatly increased the density of gold particles to a level that was comparable to the one obtained using antibodies against MC58 PorA (Fig. 2e), which is known to confer protection in humans.

Coverage of the MenB Population Diversity. To properly test whether the 5CVMB vaccine formulation was able to induce protection against the majority of the MenB strains, we assembled and characterized a very large collection of clinical isolates representing as closely as possible the global population diversity. In total, 214 *N. meningitidis* strains were collected: 56 from the U.S. and Canada, 44 from the United Kingdom, 98 from other European countries, 2 from New Zealand, 6 from Aus-

tralia, and 8 from other regions of the world. The collection contained mostly recent clinical isolates, although a minority of older laboratory strains were included to bridge the data to those generated in the past with well known strains. Eighty-five of the 214 strains were found to be suitable for BCA assays using several batches of baby rabbit complement. The main properties of the 85 strains are reported (Table 2). Four meningococcal hypervirulent clusters, ST32 cpx or ET5, ST41/44 cpx or lineage 3, ST8 cpx or cluster A4, and ST11 cpx or ET37, represent 56 of 85 (65.9%) of the total strains; 29 of 85 (34.1%) of the strains represent emerging lineages of pathogenic strains that were classified as “others” because they do not belong to any known hypervirulent cluster.

The sera obtained by immunizing mice with the 5CVMB vaccine formulated with aluminum hydroxide were tested in a bactericidal assay against this panel of 85 strains. We found that 66 of 85 (77.7%) of the strains tested were killed at serum dilutions $\geq 1/128$ (Fig. 3a). This threshold titer correlates with a positive result using human complement (27). Killing of $\approx 78\%$ of the strains by a meningococcal B vaccine is very encouraging, especially when compared with the 17 of 85 strains (20%) and with the 18 of 85 strains (21.2%) killed by the OMV vaccines made from the Norwegian strain H44/76 (Fig. 3a, center column) and the New Zealand strain NZ98/254 (Fig. 3a, right column), which represent the best vaccines available so far.

A closer observation of the strains covered showed that the Nw vaccine induced BCA titers $>8,000$ against all 9 strains with PorA P1.16, identical to that of the vaccine strain, titers of 512 or lower against 8 strains carrying a different PorA, and no BCA against the remaining 68 strains. Similarly, the Nz vaccine induced high BCA titers against the 11 strains with PorA P1.4 identical to the vaccine strain, low BCA titers against 7 strains with different PorA, and no BCA against the remaining 67 strains. The poor coverage of strains and hypervirulent lineages provided by OMV vaccines (Fig. 3b) validates the fragmentary observations obtained so far in preclinical and clinical studies showing that OMV vaccines induce immunity that is mostly PorA-specific.

In marked contrast to the OMV vaccines, and as expected from the antigen composition, the 5CVMB vaccine induced broader protection that was not serosubtype-specific and covered most of the population diversity. The protection induced by 5CVMB formulated with aluminum (Fig. 3b) was complete (100%) against all strains of the panel from the hypervirulent cpx ST32 and ST8, almost complete (95%) against the hypervirulent cpx ST41/44, and substantial against strains of hypervirulent cluster ST11 and those classified as others (65% and 59%, respectively). A subset of strains, for which human complement could be used for the bactericidal assay, was killed by the vaccine-induced antibodies in the presence of human complement. For instance, the BCA titers obtained against MenB strains MC58, 2996, and NZ98/254 were 1,024, 128, and 64, respectively.

To investigate whether the coverage of the 5CVMB vaccine could be increased, mice were immunized with the same vaccine antigens but adjuvanted by aluminum hydroxide combined with CpG oligonucleotides (28, 29). The results showed that the strain coverage increased to 91.7% (Fig. 3c). We also tested the vaccine using an oil-in-water emulsion, MF59, which is licensed for human use in Europe, as adjuvant (30). The presence of the MF59 increased the coverage to 94.1% (Fig. 3c). Interestingly, when FCA was used as adjuvant, coverage by BCA reached 97.6% (Fig. 3c). The addition of CpG to 5CVMB with aluminum hydroxide or the use of MF59 or FCA (Fig. 3d) significantly increased the coverage of strains belonging to the ST11 cluster and of those classified as others. These data show that in mice the antigens included in the vaccine can induce

Table 2. Characteristics of 85 *N. meningitidis* strains used for bactericidal assays

Hypervirulent clusters	Year of isolation			Total
	Before 1980	1980–1995	1996–2002	
ST32 cpx (ET5)	1	4	6	11
ST41/44 cpx (lineage 3)	0	5	16	21
ST8 cpx (A4)	1	2	4	7
ST11 cpx (ET37)	2	4	11	17
Others*	3	8	18	29
Total	7	23	55	85

*The strains that do not belong to any of the hypervirulent clusters have been classified as others.

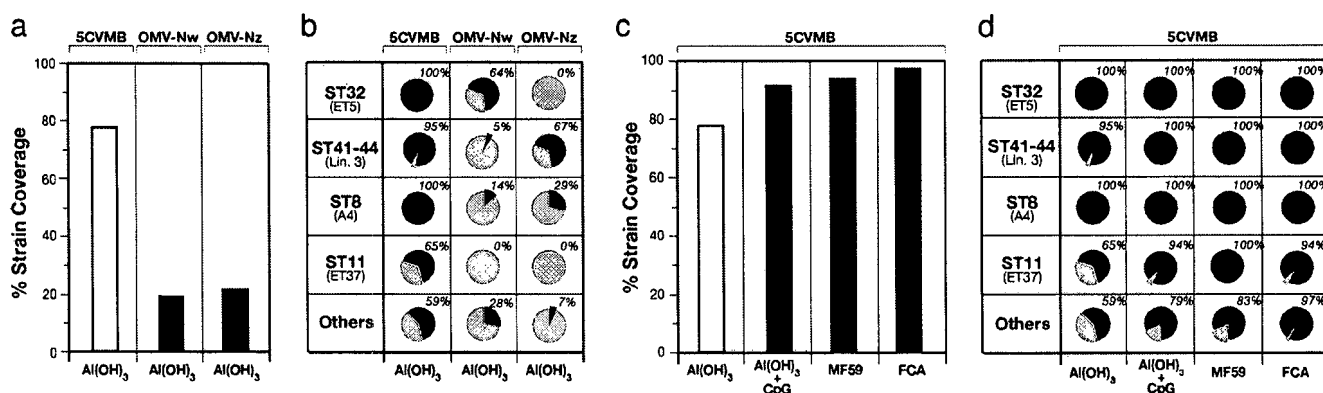


Fig. 3. Protective effect of 5CVMB vaccine. The analysis has been performed by testing the immune sera for BCA against 85 *N. meningitidis* strains using baby rabbit serum as complement source (16). Results are expressed as the percentage of strains killed with titers ≥ 128 . (a and b) Comparison of strain coverage induced by 5CVMB, OMVNw, and OMVNz vaccines (a) and the respective vaccine coverage of the 85 strains grouped into hypervirulent clusters (b). (c and d) Strain coverage induced by different formulations of 5CVMB vaccine (with aluminum hydroxide, aluminum hydroxide plus CpG 826, MF59, or FCA) (c) and the respective vaccine coverage of hypervirulent clusters (d).

immunity against nearly all MenB strains when the immune response is optimized. The increased strain coverage could be due to the ability of the adjuvants to induce a higher immune response or to influence antigen conformation by exposing additional epitopes to the immune system. Further work will be needed to address this issue. In humans, the immune response can be optimized by the addition of CpG, by using MF59, or with a booster dose after primary immunization.

All animals treated with different formulations of 5CVMB vaccine were healthy throughout the experiments, based on daily observations, and no overt toxicity was observed.

To confirm that the antisera obtained were able to confer protection *in vivo*, representative sera from mice immunized with 5CVMB were also used for passive immunization of infant rats, which were subsequently challenged i.p. with MenB strain 2996. In two experiments where the animals were challenged with 6×10^4 and 5×10^3 virulent bacteria, respectively (Table 3), all infant rats that had received PBS as negative control developed a bacteremia after 18 h. In contrast, no bacteria were recovered from the blood of rats that had been passively immunized.

Discussion

We have described a universal vaccine against MenB, a bacterium that causes a disease against which conventional vaccinol-

ogy has been ineffective and that still kills many young people in both developed and developing countries. The vaccine, developed by using novel antigens identified by reverse vaccinology, covers 78% of the strains in the basic formulation using aluminum hydroxide as adjuvant, and coverage can be increased to >95% of the strains by using other adjuvants. The progress compared with vaccines available so far is gigantic; in fact, OMV vaccines, which are the best vaccines against MenB developed during the last 30 years, are shown to cover only 20% of the MenB strains.

The work also shows that universal protein-based vaccines can be developed against those encapsulated bacteria that are usually targeted by conjugate vaccines. This finding should foster research on reverse vaccinology to identify protein-based vaccines for other pathogens, such as pneumococcus, where there are too many serotypes of capsular polysaccharides to make conjugate vaccines capable of protecting against all strains, against *Staphylococcus*, group A *Streptococcus*, and other microorganisms.

Although protein-based vaccines have also been described for group B *Streptococcus* (31) and other pathogens, so far most of the data in the literature were obtained by using vaccines formulated with adjuvants unsuitable for human use, such as FCA, and usually tested against a limited number of bacterial strains, so that the coverage of the population diversity could not

Table 3. Passive protection in the infant rat meningococcal bacteremia model

Exp.	2996 (challenged CFU)	Treatment	Serum dilution or dose of mAb, µg, per rat	No. positive/total	CFU/ml (geometric mean)
1	63,000	Anti-PorA(Pl.2) mAb	2	0/3	<1
		Anti-5CVMB mouse serum	1:5	0/3	<1
			1:20	0/3	<1
		Anti-5CVMB rabbit serum	1:5	0/3	<1
			1:20	0/3	5
		PBS control		3/3	146,590
2	5,000	Anti-PorA(Pl.2) mAb	1	0/4	<1
		Anti-5CVMB mouse serum	1:10	0/4	<1
			1:50	0/4	<1
		Anti-5CVMB rabbit serum	1:10	0/4	<1
			1:50	0/4	<1
		PBS control		4/4	8,250

CFU, colony-forming unit.

be totally predicted. Therefore, the question of whether protein-based vaccines against encapsulated bacteria are feasible for use in humans was still pending. In this study we have used the antigens derived from the genome mining of MenB, and we have asked the critical questions necessary for extending their large-scale use to humans. To do so, we expressed them in a system suitable for industrial manufacturing; we formulated them with an adjuvant suitable for human use, such as aluminum hydroxide, and we tested the immune response against an unusually large panel of strains enriched with recent clinical isolates and designed to represent as much as possible the true diversity of the bacterial population.

If the results reported here are confirmed in clinical trials, this vaccine is likely to conquer one of the most devastating diseases that still cause morbidity and mortality in children and adolescents.

Materials and Methods

Cloning Expression and Purification of Vaccine Components. Single recombinant proteins were expressed and purified as previously described (13, 16, 17). Genes considered in this study were from the genome of *N. meningitidis* NZ98/254 strain in the case of GNA2132, MC58 strain in the case of GNA1870, and 2996 strain in the case of GNA1030, GNA2091, and NadA.

All of the proteins present in the multicomponent vaccine 5CVMV were produced in *Escherichia coli* devoid of the predicted leader peptide using the pET24b+ as expression vector and *E. coli* BL21 (DE3) as expression host. NadA corresponds to the NadA_{Δ351–405} recombinant form (17).

To generate the fusion GNA2132–1030, the *gna2132* gene was amplified by PCR from the NZ98/254 strain by using the following oligonucleotides: 2132 forward (CGCGGATC-CGCTAGC-CCCAGATGTTAAATCGGC) and 2132 reverse (CGGGGATCC-ATCCTGCTCTTTTTTGCCGG) containing the *NheI* and *BamHI* restriction sites, respectively (restriction sites are underlined); the *gna1030* gene was amplified from the 2996 strain by using 1030 forward (CGCGGATC-CGGTGGTGGTGGT-GCCACCTACAAAGTGGAC) and 1030 reverse (CCCGCTCGAG-TTATTGTTTGGCTGCTCGAT) oligonucleotides, which include the *BamHI* and *XhoI* restriction sites, respectively. A polyglycines linker was added between the two proteins of the fusion inserting the corresponding DNA sequence as tail in the sequence of the primer forward. The insertion of *NheI* and *BamHI* sites results in alanine-serine or glycine-serine additional amino acids, respectively.

Amplified DNA fragments were digested with *NheI*/*BamHI* and with *BamHI*/*XhoI* enzymes and cloned in pET24b+ vector digested with *NheI*/*XhoI*.

To create the fusion GNA2091–1870, the *gna2091* gene was amplified from the 2996 strain by using the oligonucleotides 2091 forward (CGCGGATCCCATATG-GTCAGCGCAGTA-ATCGGA) and 2091 reverse (CGGGGATCC-GCGTTG-GACGTAGTTTTG) containing the *NdeI* and *BamHI* restriction sites, respectively; the *gna1870* gene was amplified from the MC58 strain by using 1870 forward (CGCGGATCC-GGAGGGGGTGGTGTGCG) and 1870 reverse (CCCGCTC-GAG-TTATTGCTTGCGGCAAG) oligonucleotides, including the *BamHI* and *XhoI* restriction sites, respectively.

Amplified DNA fragments were digested with *NdeI*/*XhoI* and *BamHI*/*XhoI* enzymes and cloned in pET24b+ vector digested with *NdeI*/*XhoI*.

The recombinant proteins were expressed in *E. coli* and purified by standard methods (32).

Mouse Immunizations. To prepare antisera, 20 μg of individual antigens GNA2132, GNA1030, GNA2091, GNA1870, NadA, GNA2132–1030, and GNA2091–1870 or a combination of 20

μg each of GNA2132–1030, GNA2091–1870, and NadA was used to immunize 6-week-old CD1 female mice (Charles River Breeding Laboratories). Five to 10 mice per group were used. The antigens were administered i.p. together with aluminum hydroxide (3 mg/ml) on days 0, 21, and 35. The same immunization schedule was performed with different adjuvants such as CpG 1826 plus aluminum hydroxide, MF59, or FCA. Blood samples for analysis were taken on day 49. To prepare antisera against OMV preparation (from H44/76 strain for NW and NZ98/254 strain for NZ), 10 μg of each adsorbed to aluminum hydroxide was used. The same immunization schedule was used to immunize New Zealand White rabbits. The rabbits were injected in several lymph nodes with 5CVMV vaccine (25 μg of each antigen). The treatments were performed in accordance with internal animal ethical committee and institutional guidelines.

FACS Analysis. The analysis was determined by using a FACScan flow cytometer as described previously (16). Polyclonal sera were tested at a 1/200 dilution. Antibody binding was detected by using a secondary anti-mouse (whole molecule) FITC-conjugated (Sigma) antibody.

Immunoelectron Microscopy. Whole-cell, negative-stain, ImmunoGold labeling was performed by using a modified procedure described by Fletcher *et al.* (22). Briefly, *N. meningitidis* serogroup B strains cells were fixed for 60 min at room temperature in 4% paraformaldehyde plus 0.05% glutaraldehyde in PBS (pH 7.2). After fixation, droplets of cells were placed on Formvar carbon-coated grids (Agar Scientific) for 5 min. Excess fluid was wicked off, and blocking was accomplished in two stages by using PBS plus 1% BSA for 5 min and, later, PBS containing 1% coldwater fish gelatin (Fluka) for 10 min. Excess aldehyde was quenched by using 0.02 M glycine in PBS for 5 min. Grids were inverted over polyclonal antibodies or mAbs (diluted in PBS plus 1% BSA) for 60 min in a humidified chamber. Grids were rinsed five times for 1 min in PBS plus 1% BSA. Antigen was detected by incubation for 60 min with goat anti-mouse IgG plus IgM conjugated to 10-nm colloidal gold beads (BB International, Cardiff, U.K.) diluted in PBS-BSA. Rinsing took place in PBS (four times for 1 min). Grids with cells were stabilized with 1% glutaraldehyde in PBS. Each sample was then rinsed five times in distilled water. Grids were finally treated with uranyl acetate and examined by a TEM GEOL 1200EX II transmission electron microscope.

Serum Bactericidal Assay. Serum BCA against *N. meningitidis* strains was evaluated as previously described (23). The complement source was pooled baby rabbit sera (Cedarlane Laboratories or Pel-Freez Biologicals) or human serum from a healthy adult with no detectable intrinsic bactericidal activity.

Infant Rat Protection Assay. The ability of anti-5CVMV to confer protection against *N. meningitidis* bacteremia was evaluated as previously described in infant rats challenged i.p. (33). Bacteria numbers in the blood cultures were obtained by plating out onto chocolate agar 100 μl of blood collected 18 h after challenge.

We thank Marco Tortoli, Giacomo Matteucci, and the animal care facility at Novartis Vaccines for technical assistance; Roberto Olivieri and Erwin Swennen for fermentations; Sandra Nuti for help with FACS analysis; Anna Rita Taddei for technical help with ImmunoGold labeling and transmission electron microscopy; Maria Scarselli for help in bioinformatics; and Cesira Galeotti, Duccio Medini, and Claudio Donati for discussion. We also thank Catherine Mallia for manuscript editing and Giorgio Corsi for artwork.

1. Gotschlich, E. C., Goldschneider, I. & Artenstein, M. S. (1969) *J. Exp. Med.* **129**, 1367–1384.
2. Gotschlich, E. C., Liu, T. Y. & Artenstein, M. S. (1969) *J. Exp. Med.* **129**, 1349–1365.
3. Caugant, D. A., Bovre, K., Gaustad, P., Bryn, K., Holten, E., Hoiby, E. A. & Froholm, L. O. (1986) *J. Gen. Microbiol.* **132**, 641–652.
4. Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3140–3145.
5. World Health Organization (2001) *Wkly. Epidemiol. Rec.* **37**, 281–288.
6. Rosenstein, N. E., Perkins, B. A., Stephens, D. S., Lefkowitz, L., Cartter, M. L., Danila, R., Cieslak, P., Shutt, K. A., Popovic, T., Schuchat, A., *et al.* (1999) *J. Infect. Dis.* **180**, 1894–1901.
7. Noah, N. & Henderson, B. (2002) *Surveillance of Bacterial Meningitis in Europe 1997/8* (Communicable Disease Surveillance Centre, London), pp. 1–16.
8. Goldschneider, I., Gotschlich, E. C. & Artenstein, M. S. (1969) *J. Exp. Med.* **129**, 1307–1326.
9. Costantino, P., Viti, S., Podda, A., Velmonte, M. A., Nencioni, L. & Rappuoli, R. (1992) *Vaccine* **10**, 691–698.
10. Snape, M. D. & Pollard, A. J. (2005) *Lancet Infect. Dis.* **5**, 21–30.
11. Tappero, J. W., Lagos, R., Ballesteros, A. M., Plikaytis, B., Williams, D., Dykes, J., Gheesling, L. L., Carlone, G. M., Hoiby, E. A., Holst, J., *et al.* (1999) *J. Am. Med. Assoc.* **281**, 1520–1527.
12. Tettelin, H., Saunders, N. J., Heidelberg, J., Jeffries, A. C., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Ketchum, K. A., Hood, D. W., Peden, J. F., Dodson, R. J., *et al.* (2000) *Science* **287**, 1809–1815.
13. Pizza, M., Scarlato, V., Massignani, V., Giuliani, M. M., Arico, B., Comanducci, M., Jennings, G. T., Baldi, L., Bartolini, E., Capecchi, B., *et al.* (2000) *Science* **287**, 1816–1820.
14. Rappuoli, R. (2000) *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 445–450.
15. Litt, D. J., Savino, S., Beddek, A., Comanducci, M., Sandiford, C., Stevens, J., Levin, M., Ison, C., Pizza, M., Rappuoli, R. & Kroll, J. S. (2004) *J. Infect. Dis.* **190**, 1488–1497.
16. Massignani, V., Comanducci, M., Giuliani, M. M., Bambini, S., Adu-Bobie, J., Arico, B., Brunelli, B., Pieri, A., Santini, L., Savino, S., *et al.* (2003) *J. Exp. Med.* **197**, 789–799.
17. Comanducci, M., Bambini, S., Brunelli, B., Adu-Bobie, J., Arico, B., Capecchi, B., Giuliani, M. M., Massignani, V., Santini, L., Savino, S., *et al.* (2002) *J. Exp. Med.* **195**, 1445–1454.
18. Granoff, D. M., Moe, G. R., Giuliani, M. M., Adu-Bobie, J., Santini, L., Brunelli, B., Piccinetti, F., Zuno-Mitchell, P., Lee, S. S., Neri, P., *et al.* (2001) *J. Immunol.* **167**, 6487–6496.
19. West, D., Reddin, K., Matheson, M., Heath, R., Funnell, S., Hudson, M., Robinson, A. & Gorringe, A. (2001) *Infect. Immun.* **69**, 1561–1567.
20. Gorringe, A. R., Reddin, K. M., Funnell, S. G., Johansson, L., Rytönen, A. & Jonsson, A. B. (2005) *Vaccine* **23**, 2214–2217.
21. Welsch, J. A., Moe, G. R., Rossi, R., Adu-Bobie, J., Rappuoli, R. & Granoff, D. M. (2003) *J. Infect. Dis.* **188**, 1730–1740.
22. Fletcher, L. D., Bernfield, L., Barniak, V., Farley, J. E., Howell, A., Knauf, M., Ooi, P., Smith, R. P., Weise, P., Wetherell, M., *et al.* (2004) *Infect. Immun.* **72**, 2088–2100.
23. Giuliani, M. M., Santini, L., Brunelli, B., Biolchi, A., Arico, B., Di Marcello, F., Cartocci, E., Comanducci, M., Massignani, V., Lozzi, L., *et al.* (2005) *Infect. Immun.* **73**, 1151–1160.
24. Capecchi, B., Adu-Bobie, J., Di Marcello, F., Ciocchi, L., Massignani, V., Taddei, A., Rappuoli, R., Pizza, M. & Arico, B. (2005) *Mol. Microbiol.* **55**, 687–698.
25. Olin, P., Rasmussen, F., Gustafsson, L., Hallander, H. O. & Heijbel, H. (1997) *Lancet* **350**, 1569–1577.
26. Barocchi, M. A., Massignani, V. & Rappuoli, R. (2005) *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 349–358.
27. Andrews, N., Borrow, R. & Miller, E. (2003) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 780–786.
28. Davis, H. L., Weeratna, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J. & Krieg, A. M. (1998) *J. Immunol.* **160**, 870–876.
29. Weeratna, R. D., McCluskie, M. J., Xu, Y. & Davis, H. L. (2000) *Vaccine* **18**, 1755–1762.
30. Podda, A. & Del Giudice, G. (2003) *Expert Rev. Vaccines* **2**, 197–203.
31. Maione, D., Margarit, I., Rinaudo, C. D., Massignani, V., Mora, M., Scarselli, M., Tettelin, H., Brettoni, C., Iacobini, E. T., Rosini, R., *et al.* (2005) *Science* **309**, 148–150.
32. Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, H. L., Speicher, D. W. & Wingfield, P. T., eds. (1997) *Current Protocols in Protein Science* (Wiley, New York), pp. 6.0.1–6.7.14, 9.4.1–9.4.16.
33. Moe, G. R., Tan, S. & Granoff, D. M. (1999) *Infect. Immun.* **67**, 5664–5675.