



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

05-7268

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO

"COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE COMPRENDEN LIPOOLIGOSACARIDOS DEL
INMUNOTIPO L2 y/o L3 A PARTIR DE LGTB-NEISSERIA MINIGITIDIS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/095

71. SOLICITANTE GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

DOMICILIO RIXENSART, BÉLGICA

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

22. BOGOTÁ, D.C. 28 ENE 2005

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 05007268 00000000 Folios: 91
Fecha (AMH): 2005-01-28 15:41:35
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAR
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

09-NOV-2005

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)Nombre: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS
SA.Dirección: Rue de l'Institut 89, B-1330
Rixensart, Bélgica.Nacionalidad o Domicilio: Rixensart,
Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

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

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)Nombre: 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, Bélgica.

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2003/008568Fecha: 31/07/03Publicación Internacional No. WO 2004/014417 A3Fecha: 19/02/04

⑥

Título (54) "COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE COMPRENDEN LIPOOLIGOSACARIDOS
DEL INMUNOTIPO L2 Y/O L3 A PARTIR DE LGTB-NEISSERIA MINIGITIDIS "

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/095

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

GB

02/08/02

0218037.0

GB

02/08/02

0218036.2

GB

02/08/02

0218035.4

GB

02/08/02

0218051.1

GB

30/08/02

0220197.8

GB

30/08/02

0220199.4

GB

01/11/02

0225524.8

GB

01/11/02

0225531.3

GB

24/12/02

0230164.6

GB

24/12/02

0230168.7

GB

24/12/02

0230170.3

GB

05/03/03

0305028.3

⑨

Comprobante de Pago No. 05 - 5.626Fecha: 26/01/05

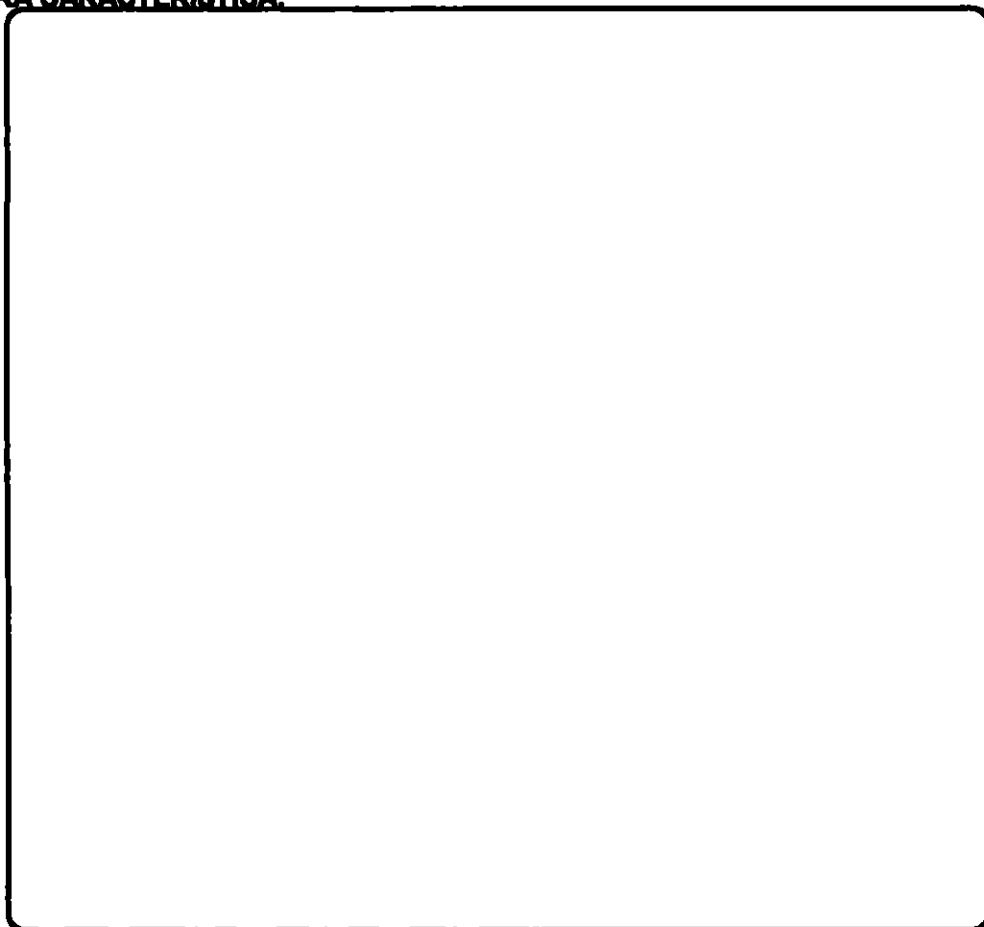
ANEXOS

10

- ☒ 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, Publicación con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

G.C. 39.690.713 Usaqué

T.P. 53.215

2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacon : 05007268 00000000 Folios: 91
Fecha (AMB): 2005-01-26 15:41:35
Tramite : 011 OCT-PATENT 325 FASE NACT 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 5,626
FECHA : ENERO 26 DE 2005

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	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 LLOREDADA 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 esta 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 LLOREDADA RICAURTE

T.P. No. 53.215

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

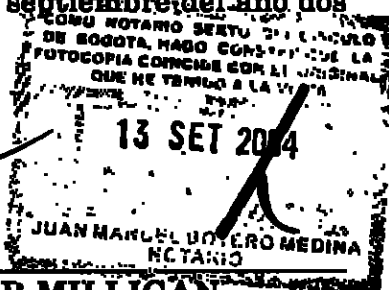
CERTIFICO:

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 del año dos mil cuatro.



JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



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

- This public document/Le présent acte public**

- Certified/Attesté**

6. the/le 1104

COMO NOTARIO JERONIMO...
DE BOGOTA, HAGO SE...
FOTOCOPIA CONVIDE...
QUE ME FIRMAR... A LOS VISTA

by Her Majesty's Pri...
13 SEP 2004
Mar 2004
Juan Manuel Nuncio...
NC

G 749037

- 9. Stamp:**
timbre:



10. Signature: 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 BIOLOGICALS 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 Nb. 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, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten 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, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS 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 Bogotá, 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.

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

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.

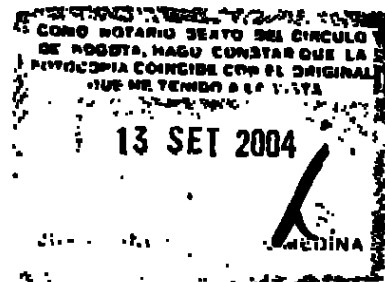
Notary Public (Notario Público).

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.



6

7

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

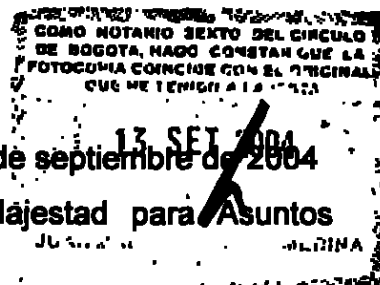
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. Pais: 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
Anita Escobar
CUBA HA APARECIDO EN EL
DOCUMENTO DE EMERGENCIA
LAS FUENTES INDICADAS

BOGOTÁ, 13 SET 2004
QUE HE TRASE A LA VISTA
CUBA HA APARECIDO EN EL
DOCUMENTO DE EMERGENCIA
LAS FUENTES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

260567
13 SET 10 A 10:47
JCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

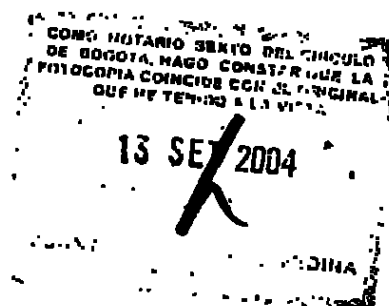
W. Glass
Por el Secretario de Estado

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



Extracts Publications
Edw. G.

9

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP03/08568

A. CLASIFICACION DE MATERIA IPC 7 A61K 39/095 C12N1/21 A61P37/04 A61K 39/102 Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI		
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-INTERNO, BIOSIS, EMBASE, PAJ, Dato WPI		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	JENNINGS M P ET AL:” Análisis molecular de un sitio para la biosíntesis y expresión de la fase variable de la estructura lipopolisacárida del terminal lacto-N-neotetraosa en meningitis Neisseria” MOLECULAR MICROBIOLOGY. ENGLAND NOV 1995, vol. 18, no. 4, noviembre 1995 (1995-11), páginas 729-740, XP002270109 ISSN: 0950-382X	11
Y	página 731, columna 1, paragrafo 2-columna 2 página 733, columna 1, paragrafo 2-página 734, columna 1, paragrafo 2 página 737, columna 1, último paragrafo- columna 2 ----- ---/---	1-8, 12-14, 16-20, 35,48
☒ 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 'P' 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 '&' documento miembro de la misma familia de patentes		
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 7 de mayo de 2004		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 18/05/2004
Nombre y dirección del correo de ISA European Patent Office 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

Forma PCT ISA/ 210 (segunda hoja) (Enero 2004)

Folios 10 y 11 forjados
es

72

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08568

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	WO 01/09350 A(DALEMANS WILFRIED L J ; SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG (BE); THIRY GEORG) 8 de febrero 2001 (2001-02-08) citado en la solicitud resumen página 2, línea 1- línea 22 página 17, línea 12-línea 25 página 20, línea 11-línea 22 página 23, línea 21-página 24, línea 9 página 31, línea 1- línea 22 página 33, línea 1- línea 30 página 36, línea 5- línea 28 ejemplo 8	1-8 16-20, 36,39, 40,42 43,45, 47,49
Y	VERHEUL A F M ET AL: "PREPARACIÓN, CARACTERIZACION, E INMUNOGENICIDAD DEL INMUNOTIPO MENINGOCOCO L2 Y L3, 7, 9 DEL GRUPO FOSFOETANOLAMINA – QUE CONTIENE CONJUGADOS DE PROTEINA OLIGOSACARIDA" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, US, vol.59, no.3, 1 de marzo de 1991 (1991-03-01), páginas 843-851, XP002032436 ISSN: 0019-9567 resumen página 844, columna 1, paragrafo 2-página 845, columna 1, paragrafo 1 página 845, columna 1, paragrafo 3 página 847, columna 1, paragrafo 2-columna 1, último paragrafo	12,14
Y	GAO LIHUI HU XUJING ET AL; "Estudio de la antigenicidad LOS de 2 cepas candidatas para vacuna meningococa del serogrupo B" BIOSIS,. XP002133714 resumen	12
X	WAKARCHUK W ET AL: "“Relaciones funcionales del sitiogenético que codifica las encimas de la glicosiltransferasa comprendidas en la expresión de la estructura lipopolisacárida del terminal lacto-N-neotetraosa en meningitis Neisseria". JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CMEMISTRY, BALTIMORE, MD, US, vol. 271, no. 32, 9 de agosto de 1996 (1996-08-09), páginas 19166-19173, XP002084666 ISSN: 0021-9258 resumen	11

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/EP 03/08568

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No
X	WO 94/08021 A (LEY PETER ANDRE V D ;NEDERLANDEN STAAT (NL); POOLMAN JAN THEUNIS () 14 de abril 1994 (1994-04-14) citado en la socilitud	21, 24-28 33,34, 37,38
Y	resumen página 5, línea 13- página 6, línea 16 página 6, línea 31- página 7, línea 8 página 9, línea 16- línea 35 página 15, línea 13- línea 35 página 16, línea 11- línea 22 página 17	40,46, 50,51 35,36 39,43, 47-49
X	QUAKYI EMMANUEL K ET AL: “La modulación de las actividades biológicas de endotoxinas meningococo por asociación con proteínas de membrana externa no está unida inevitablemente a la toxicidad” INFECTION AND IMMUNITY, vol. 65, no. 5, 197, páginas 1972-1979, XP001184760 ISSN: 0019-9567 resumen página 1972, column 2, último paragrafo-página 1973, column 2, paragrafo 1 página 1974, column 2, último paragrafo-página 1978, column 1, paragrafo 1 página 1978, column 1, paragrafo 4 página 1978, column 2, último paragrafo -----	1-3, 11, 12,16,19
X	GU X X ET AL: “Preparación, caracterización e inmunogenicidad del lipoligosacárido meningococo – derivado de los conjugados de la proteína oligosacárido” INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, US, vol.61, no.5, de mayo de 1993 (1993-05), páginas 1873-1880, XP002102900 ISSN: 0019-9567 resumen página 1873, column 2, paragrafo 1 paragrafo 2 página 1876, column 2, paragrafo 2-página 1878, column 2, paragrafo 3 página 1878, column 2, último paragrafo-página 1879, column 2, paragrafo 3 página 1878, column 2, último paragrafo-página 1879, column 1, paragrafo 1 ----- -/--	12,14, 16,17

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08568

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	ZAKIROV M M ET AL: “Actividad inmunológica de la meningitis Neissera lipoligosacárida incorporada a liposomas” ZHURNAL MIKROBIOLOGII EPIDEMIOLOGII I IMMUNOBIOLOGII, vol. 0, no. 1, 1995, páginas 49-53, XP008027121 ISSN: 0372-9311 resumen -----	12,13,16
Y	EP 0 941 738 A (AMERICAN CYANAMID CO) 15 de septiembre de 1999 (1999-09-15) citado en la solicitud	40,42, 43,45,48
A	paragrafos '0013!, '0014!, '0016!, '0029!, '0030!, '0034!- '0038!; reivindicaciones 1,4-7, 13 -----	21-36
P,X	US 6 531 131 B1 (GU XIN-XING ET AL) 11 de marzo de 2003 (2003-03-11) resumen columna 2, línea 33-columna 3, línea 1 columna 3, línea 18-línea 22 columna 5, línea 20-línea 43 ----- -/--	12, 14, 16,17

13

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08568

Casilla 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 18, 20, 22-25 están dirigidas al método del tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados de la 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 SIGUIENTE INFORMACION hoja PCT/ISA/210

3. ☐ Reivindicaciones No.:

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

Casilla 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:

ver información adicional

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.: 1-8, 11-31, 37-39 (parcialmente), 32-36, 40-52 (completamente)

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.

Información continuada de PCT/ISA/210

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

1. Reivindicaciones: 1-8,11-20 (parcialmente)

LgtB- cepa Neisserial con un inmunotipo L2 LOS o L3; preparación de burbuja neisserial derivada de ello; preparación de burbuja neisserial que comprende una combinación de burbujas derivadas de la cepa Neisserial con un inmunotipo L2 LOS o un inmunotipo L3 donde al menos una cepa es lgtB-; preparación LOS aislada de lgrB- cepa neisserial que comprende el inmunotipo L2 y/o L3 LOS; composición o vacuna inmunogénica que comprende dicha preparación de burbuja neisserial o preparación LOS y proceso para fabricar dicha vacuna.

2. Reivindicaciones: 1-8,11-20 (parcialmente)

Cepa Neisserial con un inmunotipo L2 LOS o L3 LOS; preparación de burbuja neisserial que comprende una combinación de burbujas derivada de una cepa Neisserial con un inmunotipo L2 LOS y una cepa Neisserial con un inmunotipo L3 LOS; preparación LOS aislada de dicha cepa neisserial que comprende un inmunotipo L2 y/o L3 LOS; composición o vacuna inmunogénica que comprende dicha preparación de burbuja neisserial o preparación LOS y proceso para fabricar dicha vacuna.

3. Reivindicaciones: 9-20 (parcialmente)

Cepa Neisserial que tiene 2 o más de las siguientes moléculas de membrana externa reguladas hacia abajo, PorA, PorB, OpA, OpC, PilC o FrpB; preparación de burbuja Neisserial derivada de dicha cepa neisserial; preparación LOS aislada de dicha cepa neisserial; composición o vacuna inmunogénica que comprende dicha preparación de burbuja Neisserial o preparación LOS y proceso para fabricar dicha vacuna.

4. Reivindicaciones: 21-52

Preparación de burbuja de una cepa bacteriana gramo negativa con una proteína de membrana externa conjugada a LOS integrados en su membrana externa; composición o vacuna inmunogénica que comprende dicha preparación de burbuja; proceso para fabricar dicha preparación de burbuja.

Información continuada de PCT/ISA/210**Continuación de la casilla I.2**

Las presentes reivindicaciones 21-31, 37-39 se relacionan con un número extremadamente grande de posibles preparaciones de burbuja, a saber derivadas de cepas bacterianas gram negativas. El soporte dentro del significado del Artículo 6 PCT y/o revelación dentro del significado del Artículo 5 PCT se encuentra, sin embargo, para únicamente una proporción muy pequeña de preparaciones de burbuja reivindicadas. En el presente caso, a las reivindicaciones les falta soporte, y a la solicitud le falta revelación, tal que una búsqueda significativa sobre todo el alcance reivindicado es imposible. Por consiguiente, se ha llevado a cabo la búsqueda para aquellas partes de las reivindicaciones que parecen estar sustentadas y reveladas, a saber aquellas partes relacionadas con las preparaciones de burbuja de *Moraxella catarrhalis*, una cepa no tipeable *Haemophilus influenzae* y de las cepas *Neisseriales* (ver la descripción en la página 13, línea 6-11 y ejemplos).

Se atrae la atención del solicitante al hecho de que no es necesario que las reivindicaciones o partes de las reivindicaciones, relacionadas con invenciones respecto de las cuales no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional sean el sujeto de un examen preliminar internacional (Regla 66.1(e) PCT). Se le notifica al solicitante que la política de la EPO al actuar como una Autoridad de Examen Preliminar Internacional normalmente es no llevar a cabo un examen preliminar en asuntos que no se han buscado. Este es el caso prescindiendo de si las reivindicaciones han sido enmendadas siguiendo el recibo del reporte o durante algún proceso de Capítulo II.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP03/08568

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 770360 B2 AU 6833600 A BR 0012974 A CA 2380840 A1 CN 1377415 T CZ 20020403 A3 WO 0109350 A2 EP 1208214 A2 HU 0203056 A2 JP 2003506049 T NO 20020506 A PL 353891 A1 TR 200200275 T2 TR 200202448 T2	19-02-2004 19-02-2001 07-05-2002 08-02-2001 30-10-2002 15-05-2002 08-02-2001 29-05-2002 28-12-2002 18-02-2003 02-04-2002 15-12-2003 21-05-2002 21-01-2003
WO 9408021 A	14-04-1994	NL 9201716 A AU 684720 B2 AU 4835193 A CA 2146145 A1 EP 0680512 A1 FI 951535 A JP 8501940 T WO 9408021 A1 NO 951181 A US 5705161 A	02-05-1994 08-01-1998 26-04-1994 14-04-1994 08-11-1995 01-06-1995 05-03-1996 14-04-1994 01-06-1995 06-01-1998
EP 0941738 A	15-09-1999	AU 766184 B2 AU 1954099 A BR 9902008 A CA 2264970 A1 EP 0941738 A1 JP 11322793 A	09-10-2003 23-09-1999 09-05-2000 10-09-1999 15-09-1999 24-11-1999
US 6531131 B1	11-03-2003	NINGUNA	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/EP 03/08568A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/095 C12N1/21 A61P37/04 A61K39/102

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JENNINGS M P ET AL: "Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in <i>Neisseria meningitidis</i> ." MOLECULAR MICROBIOLOGY. ENGLAND NOV 1995, vol. 18, no. 4, November 1995 (1995-11), pages 729-740, XP002270109 ISSN: 0950-382X	11
Y	page 731, column 1, paragraph 2 -column 2 page 733, column 1, paragraph 2 -page 734, column 1, paragraph 2 page 737, column 1, last paragraph -column 2 -- -/-	1-8, 12-14, 16-20, 35,48

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document, but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 May 2004

Date of mailing of the international search report

18.05.2004

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Noë, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern:

Application No

PCT/EP 03/08568

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	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 2, line 1 - line 22 page 17, line 12 - line 25 page 20, line 11 - line 22 page 23, line 21 -page 24, line 9 page 31, line 1 - line 22 page 33, line 1 - line 30 page 36, line 5 - line 28 example 8	1-8, 16-20, 36,39, 40,42, 43,45, 47,49
Y	VERHEUL A F M ET AL: "PREPARATION, CHARACTERIZATION, AND IMMUNOGENICITY OF MENINGOCOCCAL IMMUNOTYPE L2 AND L3,7,9 PHOSPHOETHANOLAMINE GROUP-CONTAINING OLIGOSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATES" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 59, no. 3, 1 March 1991 (1991-03-01), pages 843-851, XP002032436 ISSN: 0019-9567 abstract page 844, column 1, paragraph 2 -page 845, column 1, paragraph 1 page 845, column 1, paragraph 3 page 847, column 1, paragraph 2 -column 1, last paragraph	12,14
Y	GAO LIHUI HU XUJING ET AL: "Study on the LOS antigenicity of 2 candidate strains for meningococcal vaccine of serogroup B" BIOSIS, XP002133714 abstract	12
X	WAKARCHUK W ET AL: "Functional relationships of the genetic locus encoding the glycosyltransferase enzymes involved in expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in Neisseria meningitidis" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 271, no. 32, 9 August 1996 (1996-08-09), pages 19166-19173, XP002084666 ISSN: 0021-9258 abstract	11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internuz Application No
PCT/EP 03/08568

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94/08021 A (LEY PETER ANDRE V D ;NEDERLANDEN STAAT (NL); POOLMAN JAN THEUNIS () 14 April 1994 (1994-04-14) cited in the application	21, 24-28, 33,34, 37,38, 40,46, 50,51
Y	abstract page 5, line 13 -page 6, line 16 page 6, line 31 -page 7, line 8 page 9, line 16 - line 35 page 15, line 13 - line 35 page 16, line 11 - line 22 page 17	35,36, 39,43, 47-49
X	QUAKYI EMMANUEL K ET AL: "Modulation of the biological activities of meningococcal endotoxins by association with outer membrane proteins is not inevitably linked to toxicity" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 65, no. 5, 1997, pages 1972-1979, XP001184760 ISSN: 0019-9567 abstract page 1972, column 2, last paragraph -page 1973, column 2, paragraph 1 page 1974, column 2, last paragraph -page 1978, column 1, paragraph 1 page 1978, column 1, paragraph 4 page 1978, column 2, last paragraph	1-3,11, 12,16,19
X	GU X X ET AL: "Preparation, characterization, and immunogenicity of meningococcal lipooligosaccharide-derived oligosaccharide-protein conjugates" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, US, vol. 61, no. 5, May 1993 (1993-05), pages 1873-1880, XP002102900 ISSN: 0019-9567 abstract page 1873, column 2, paragraph 1 - paragraph 2 page 1876, column 2, paragraph 2 -page 1878, column 2, paragraph 3 page 1878, column 2, last paragraph -page 1879, column 1, paragraph 1 -/--	12,14, 16,17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/EP 03/08568

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZAKIROV M M ET AL: "Immunological activity of Neisseria meningitidis lipooligosaccharide incorporated into liposomes" ZHURNAL MIKROBIOLOGII EPIDEMIOLOGII I IMMUNOBIOLOGII, vol. 0, no. 1, 1995, pages 49-53, XP008027121 ISSN: 0372-9311 abstract	12,13,16
Y	EP 0 941 738 A (AMERICAN CYANAMID CO) 15 September 1999 (1999-09-15) cited in the application	40,42, 43,45,48
A	paragraphs '0013!,'0014!,'0016!,'0029!,'0030!,'0034!- '0038!; claims 1,4-7,13	21-36
P,X	US 6 531 131 B1 (GU XIN-XING ET AL) 11 March 2003 (2003-03-11) abstract column 2, line 33 -column 3, line 1 column 3, line 18 - line 22 column 5, line 20 - line 43	12,14, 16,17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/08568

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:
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 8.4(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:

see additional sheet

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.:
1-8, 11-31, 37-39 (partially), 32-36, 40-52 (completely)
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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-8,11-20 (partially)

LgtB- Neisserial strain with an L2 LOS or L3 LOS immunotype; neisserial bleb preparation derived therefrom; neisserial bleb preparation comprising a combination of blebs derived from Neisserial strains with an L2 LOS immunotype or an L3 immunotype wherein at least one strain is lgtB-; LOS preparation isolated from lgtB- neisserial strain comprising immunotype L2 and/or L3 LOS; immunogenic composition or vaccine comprising said neisserial bleb preparation or LOS preparation and process of manufacturing said vaccine.

2. Claims: 1-8,11-20 (partially)

Neisserial strain with an L2 LOS or L3 LOS immunotype; neisserial bleb preparation comprising a combination of blebs derived from a Neisserial strain with an L2 LOS immunotype and a neisserial strain with a L3 LOS immunotype; LOS preparation isolated from said neisserial strain comprising immunotype L2 and/or L3 LOS; immunogenic composition or vaccine comprising said neisserial bleb preparation or LOS preparation and process of manufacturing said vaccine.

3. Claims: 9-20 (partially)

Neisserial strain having 2 or more of the following outer membrane molecules downregulated, PorA, PorB, OpA, OpC, PilC or FrpB; Neisserial bleb preparation derived from said neisserial strain; LOS preparation isolated from said neisserial strain; immunogenic composition or vaccine comprising said neisserial bleb preparation or LOS preparation and a process of manufacturing said vaccine.

4. Claims: 21-52

Bleb preparation from a gram-negative bacterial strain with an outer-membrane protein conjugated to LOS integrated in its outer membrane; immunogenic composition or vaccine comprising said bleb preparation; process of producing said bleb preparation.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 21-31,37-39 relate to an extremely large number of possible bleb preparations, namely derived from Gram negative 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 bleb preparations 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 bleb preparations from *Moraxella catarrhalis*, a non-typeable *haemophilus influenzae* strain and from *Neisserial* strains (see description page 13, line 6-11 and examples).

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

 Internal Application No
 PCT/EP 03/08568

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0109350	A	08-02-2001	AU 770360 B2 19-02-2004
			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
			PL 353891 A1 15-12-2003
			TR 200200275 T2 21-05-2002
			TR 200202448 T2 21-01-2003
WO 9408021	A	14-04-1994	NL 9201716 A 02-05-1994
			AU 684720 B2 08-01-1998
			AU 4835193 A 26-04-1994
			CA 2146145 A1 14-04-1994
			EP 0680512 A1 08-11-1995
			FI 951535 A 01-06-1995
			JP 8501940 T 05-03-1996
			WO 9408021 A1 14-04-1994
			NO 951181 A 01-06-1995
			US 5705161 A 06-01-1998
EP 0941738	A	15-09-1999	AU 766184 B2 09-10-2003
			AU 1954099 A 23-09-1999
			BR 9902008 A 09-05-2000
			CA 2264970 A1 10-09-1999
			EP 0941738 A1 15-09-1999
			JP 11322793 A 24-11-1999
US 6531131	B1	11-03-2003	NONE

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(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 2004/014417 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61 K 39/095,
C12N 1/21, A61P 37/04, A61K 39/102

Karlne [BE/BE] GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). POOLMAN, Jan [NL/BE] GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). WEYNANTS, Vincent [BE/BE] GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2003/008568

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

(74) Agentes: LUBIENSKI, Michael, John; GlaxoSmithKline, CIP (CN925.1), 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:

0218037.0	02 de agosto de 2002 (02.08.2002)	GB
0218036.2	02 de agosto de 2002 (02.08.2002)	GB
0218035.4	02 de agosto de 2002 (02.08.2002)	GB
0218051.1	02 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	05 de marzo de 2003 (05.03.2003)	GB

(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.

(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 publicada de nuevo en el caso de rectificación de modificaciones

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

(72) Inventores: y

(75) Inventores/ solicitantes (para Estados Unidos solamente): BIEMANS, Ralph [BE/BE] GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). DENOEL, Philippe [BE/BE] GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). FERON, Christiane [BE/BE] GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). GORAJ,

(88) fecha de publicación del Reporte de Búsqueda Internacional:

22 de julio de 2004

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

(54) Título: COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE COMPRENEN LIPOOLIGOSACARIDOS DEL INMUNOTIPO L2 y/o L3 A PARTIR DE LGTB-NEISSERIA MINIGITIDIS

(57) Resumen: La presente invención se refiere al campo de composiciones de vacunas de Neisseria, su fabricación, y el uso de dichas composiciones en medicina. Más particularmente se refiere a procedimientos de fabricación de nuevas cepas meningocócicas modificadas genéticamente que son más adecuadas para la producción de vacunas de vesículas (o ampolla) de membrana externa, de Neisseria, en particular meningocócica. Los procedimientos ventajosos y productos de vacunas también se describen a base del uso de vacunas nuevas de subunidades de LOS o de vesículas (o ampollas) de membrana externa meningocócicas que se han obtenido más seguras y/o más eficaces para uso de sujetos humanos. En particular se describen las combinaciones de regulaciones hacia niveles menores de genes tales como PorA y OpA, PorA y OpC, OpA y OpC, y PorA y OpA y OpA y OpC. Alternativamente o además, se muestra que lgtB- es una mutación óptima para usar eficazmente y con seguridad LOS L3 y/o L2 en composiciones de vacunas de Neisseria. También se describen adicionalmente las vacunas de ampollas derivadas de lgtB- y mutantes meningocócicos deficientes en polisacáridos capsulares; ya que son procedimientos ventajosos para fabricar preparaciones de ampollas donde LOS se van a conservar como un antígeno importante.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



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

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/014417 A3

(51) International Patent Classification: **A61K 39/095,**
C12N 1/21, A61P 37/04, A61K 39/102

Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). FOXDMAN, Jan
[NL/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de
l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). WEYNANTS, Vin-
cent [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de
l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(21) International Application Number:
PCT/EP2003/008568

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

(74) Agent: LUBIENSKI, Michael, John; GlaxoSmithKline,
CIP (CN925.1), 980 Great West Road, Brentford, Middle-
sex TW8 9GS (GB).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(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, GI, GL,
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, MY, 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.

(30) Priority Data:
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
0225524.8 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

(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, LU, 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 SA [BE/BE]; Rue de
l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): RIEMANS, Ralph
[BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de
l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). DENOEL, Philippe
[BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de
l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). FERON, Christiane
[BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de
l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). GORAJ, Karline
[BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de

(88) Date of publication of the International search report:
22 July 2004

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

(54) Title: VACCINE COMPOSITIONS COMPRISING L2 AND/OR L3 IMMUNOTYPE I (P) LPS ACQUISITION FROM
IGTB- NEISSERIA MENINGITIDIS

(57) Abstract: The present invention relates to the field of neisserial vaccine compositions, their manufacture, and the use of such
compositions in medicine. More particularly it relates to processes of making novel engineered meningococcal strains which are
more suitable for the production of neisserial, in particular meningococcal, outer-membrane vesicle (or bleb) vaccines. Advantageous
processes and vaccine products are also described based on the use of novel LPS subunit or meningococcal outer-membrane vesicle
(or bleb) vaccines which have been rendered safer and/or more effective for use in human subjects. In particular combinations of gene
downregulations are described such as PorA & OpA, PorA and OpC, OpA and OpC, and PorA and OpA and OpC. Alternatively,
or in addition, IgtB is shown to be an optimal mutation for effectively and safely using L3 and/or L2 LPS in Neisseria vaccine
compositions. Bleb vaccines derived from IgtB and capsular polysaccharide deficient meningococcal mutants are further described;
as are advantageous methods of making bleb preparations where LPS is to be retained as an important antigen.

WO 2004/014417 A3

- 27

**COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE COMPRENDEN
LIPOOLIGOSACARIDOS DEL INMUNOTIPO L2 Y/O L3 A PARTIR DE
LGTB-NEISSERIA MENINGITIDIS**

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de composiciones de vacunas de Neisseria, su fabricación, y el uso de dichas composiciones en medicina. Más particularmente se refiere a procedimientos de fabricación de nuevas cepas meningocócicas modificadas genéticamente que son más adecuadas para la producción de vacunas de vesículas (o ampolla) de membrana externa, de Neisseria, en particular meningocócica. Los procedimientos ventajosos y productos de vacunas también se describen a base del uso de vacunas nuevas de subunidades de LOS o de vesículas (o ampollas) de membrana externa meningocócicas que se han obtenido más seguras y/o más eficaces para uso en sujetos humanos. En particular se describen las combinaciones de regulaciones hacia niveles menores de genes tales como PorA y OpA, PorA y OpC, OpA y OpC, y Por A y OpA y OpC. Alternativamente o además, se muestra que lgtB- es una mutación óptima para usar eficazmente y con seguridad LOS L3 y/o L2 en composiciones de vacunas de Neisseria. También se describen adicionalmente las vacunas de ampollas derivadas de lgtB- y mutantes meningocócicos deficientes en polisacáridos capsulares; ya que son procedimientos ventajosos para fabricar preparaciones de ampollas donde LOS se va a conservar como un antígeno importante.

**COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE COMPRENDEN
LIPOOLIGOSACARIDOS DEL INMUNOTIPO L2 Y/ L3 A PARTIR DE
LGTB-NEISSERIA MENINGITIDIS**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de las composiciones de vacunas de *Neisseria*, su fabricación y la utilización de dichas composiciones en medicina. Más particularmente se refiere a procedimientos para fabricar cepas meningocócicas nuevas modificadas genéticamente que son más adecuadas para la producción de vacunas de *Neisseria*, en particular meningocócicas, de vesículas de la membrana externa (o ampolla). También se describen los procedimientos ventajosos y productos de vacunas a base del uso de nuevas vacunas de subunidades de LOS o de vesículas de la membrana externa (o ampolla) que se han mostrado más seguras y más eficaces para uso en sujetos humanos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Neisseria meningitidis (meningococo) es una bacteria Gram negativa aislada frecuentemente del tracto respiratorio superior humano. Es una causa de enfermedades bacterianas invasivas graves tales como bacteremia y meningitis. La incidencia de enfermedad meningocócica muestra diferencias geográficas, estacionales y anuales (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (suplemento), S18 – S24, 1989). La bacteria se clasifica comúnmente según el serogrupo de su polisacárido capsular.

La mayoría de enfermedades en los países templados se debe a cepas de serogrupo B y varía en incidencia entre 1 – 10/100.000/año de total de población alcanzando algunas veces valores más altos (Kaczmarek, E. B. (1977), Común. Dis. Rep. Rev 7. R55 – 9, 1995; Scholten, R. J. P. M., Bijlmer, H. A., Poolman, J. T. y col. Clin. Infect. Dis. 16: 237 – 246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., y

col. Epidemiol. Infect. 105: 119 – 126, 1990).

Las enfermedades epidémicas dominadas por meningococos del serogrupo A, la mayoría en África central, algunas veces alcanzan niveles de incidencia hasta de 1000/100.000/año (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (suplemento), S18 – S24, 1989). Casi todos los casos como un conjunto de enfermedad meningocócica están ocasionados por meningococos de serogrupos A, B, C, W – 135 e Y y se dispone de una vacuna tetravalente de polisacáridos capsulares A, C, W – 135 e Y (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M. C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335 – 339, 1982).

La frecuencia de infecciones de *Neisseria meningitidis* han crecido en las pasadas pocas décadas en muchos países de Europa. Esto se ha atribuido a un incremento de transmisión debido a un incremento de actividades sociales (por ejemplo, piscinas, teatros, etc.). Ya no es infrecuente aislar cepas de *Neisseria meningitidis* que son menos sensibles o resistentes a alguno de los antibióticos convencionales. Este fenómeno ha creado una necesidad médica no cubierta y demanda nuevos agentes antimicrobianos, vacunas, procedimientos de selección de fármacos y ensayos de diagnósticos para este organismo.

Loas vacunas disponibles de polisacáridos se están actualmente mejorando por medio de su conjugación químicamente a proteínas portadoras (Lieberman, J. M., Chiu, S. S., Wong, V. K., y col. JAMA 275: 1499 – 1503, 1996).

Sin embargo, no se dispone de una vacuna de serogrupo B. El polisacárido capsular de serogrupo B se ha encontrado que es no inmunogénico muy probablemente porque comparte similar estructura con componentes de hospedador (Wyle, F. A., Artenstein, M. S., Brandt, M. L. y col. J. Infect. Dis. 126: 514 – 522, 1972; Finne, J. M., Leinonen, M., Mäkelä, P. M. Lancet ii.: 355 – 357. 1983). Por lo tanto se ha fijado el esfuerzo para tratar de desarrollar vacunas de serogrupo B de vesículas de la membrana externa (o ampollas) o componentes proteicos purificados de los mismos.

Los antígenos meningocócicos alternativos para el desarrollo de vacunas son lipooligosacáridos meningocócicos (abreviadamente LOS). Éstos son glicolípidos unidos a la membrana externa que se diferencian de los lipopolisacáridos (abreviadamente LPS) de las Enterobacteriáceas por la carencia de las cadenas secundarias O y de este modo se parecen a la forma basta de LPS (Griffis y col., Rev Infect Dis 1988; 10: S287 – 295). La heterogeneidad en el resto de oligosacáridos de los LOS genera diversidad estructural y antigénica entre diferentes cepas meningocócicas (Griffiss y col. Inf. Immun. 1987; 55: 1792 – 1800). Esto se ha utilizado para subdividir las cepas en 12 inmutipos. Los inmutipos L3, L7, L9 tienen una estructura de carbohidratos idéntica y se han designado por lo tanto L3, 7, 9 (o para los propósitos de esta memoria descriptiva, genéricamente como "L3"). Los LOS meningocócicos L3, 7, 9 (L3), L2 y L5 se pueden modificar mediante sialilación o mediante la adición de ácido citidina 5'-monofosfato-N-acetilneuramínico. Los anticuerpos de LOS se ha mostrado que protegen en ratas experimentales contra la infección y contribuyen a la actividad bactericida en niños infectados con *N. meningitidis* (Griffiss y col. J. Infect Dis 1984; 150: 71 – 79).

Sin embargo, un problema asociado con el uso de LOS en una vacuna meningocócica, es su toxicidad (debida a su resto de lípido A).

Los LOS están también presentes en la superficie de ampollas meningocócicas. Durante muchos años los esfuerzos se han fijado en desarrollar vacunas a base de vesículas de la membrana externa meningocócica (o ampolla) (de Moraes, J. C., Perkins, B., Camargo, M. C. y col Lancet 340: 1074 – 1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E. A. Gronnesby, J. K. y col 338: 1093 – 1096, 1991). Dichas vacunas tienen la ventaja de incluir diversas proteínas de la membrana externa en una conformación plegada adecuadamente que puede provocar una respuesta inmunológica protectora cuando se administra a un hospedador. Además, las cepas de *Neisseria* (incluyendo *N. meningitidis* serogrupo B – menB)

excretan ampollas de membranas externa en cantidades suficientes para permitir su producción a escala industrial. Sin embargo, más a menudo las ampollas se preparan mediante procedimientos que comprenden una extracción con detergente (por ejemplo, desoxicolato) de las células bacterianas (por ejemplo, EP 11243) que tiene el efecto de extraer un lote de los LOS a partir de la vacuna. Esto se desea debido a la toxicidad de LOS (también llamada endotoxina) como se ha descrito anteriormente.

Un problema adicional con el uso de LOS como antígeno de vacuna es que los 12 inmunotipos de LPS existen con un intervalo diverso de estructuras de carbohidratos (M. P. Jennings y col., Microbiology 1999, 145, 3013 – 3021). Los anticuerpos que surgen contra un inmunotipo fracasan para reconocer un inmunotipo diferente. Aunque se ha fijado el esfuerzo para producir una región "central" genérica de las porciones de oligosacárido de los inmunotipos de LOS (por ejemplo el documento WO 94/08021), la actividad bactericida de los anticuerpos generados contra los LOS modificados se pierde. De este modo una vacuna puede necesitar tener muchos componentes de LOS de inmunotipos diferentes para ser eficaz.

Existe un problema adicional con el uso de LOS (también conocidos como LPS o lipopolisacárido) como antígenos en vacunas humanas, particularmente las que llevan estructuras de sacáridos que son similares a las estructuras de sacáridos de tipo humano (por ejemplo, en glóbulos rojos humanos), de este modo planteando una cuestión segura con su uso. Todavía cambiando la estructura de LOS es problemático debido a la sensibilidad estructural de la eficacia bactericida del antígeno de LOS.

La presente invención presenta procedimientos para la mejora de uno o más de los problemas anteriores y presenta procedimientos para fabricar nuevas vacunas a base de LOS meningocócicos como un antígeno protector, en particular cuando está presente en una vesícula de membrana externa.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La materia sujeta e información descrita en las publicaciones y patentes o solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan como referencia en esta memoria decriptiva,

La referencia a "lipooligosacárido" (o "LOS") también se puede denominarse "lipopolisacárido" o "LPS".

Los términos "comprendiendo", "comprenden" y "comprende" en esta memoria descriptiva tiene la intención de los inventores de ser opcionalmente sustituibles con los términos "consistiendo en" "consisten en" y "consiste en" respectivamente en cada caso.

Los presentes inventores han encontrado que el acortamiento de las estructuras de oligosacáridos LOS conduce a la pérdida de epítomos que pueden provocar una respuesta inmune bactericida. En cambio, los inventores han encontrado que con el fin de utilizar LOS más eficazmente en una formulación de vacunas, la estructura de oligosacáridos LOS se debe conservar tanto como sea posible, pero una combinación, de justo 2 antígenos de LOS puede producir una vacuna (preferiblemente meningocócica) de *Neisseria* universalmente eficaz. Un primer aspecto de la invención es una composición inmunogénica para la prevención o tratamiento de enfermedad de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica o meningocócica B) que comprende LOS (preferiblemente meningocócicos) de *Neisseria* de inmutipo L2 y LOS de inmutipo L3. Los LOS se puede aislar bien mediante procedimientos de purificación o pueden estar presente en al menos 2 preparaciones de vesícula de membrana externa (o ampolla) derivadas de cepas de *Neisseria* L2 y L3. Con el fin de eliminar la ligera toxicidad retenida en LOS de la preparación de ampollas, pero conservar altos niveles de antígeno de LOS integrado en la ampolla, se prefiere que se extraigan las ampollas usando una baja concentración de detergente 0 – 0,3%,

preferiblemente 0,05 – 0,2%, más preferiblemente alrededor de 0,1%, preferiblemente desoxicolato (o abreviadamente DOC). Dicha combinación de antígenos de LOS es sorprendentemente ventajosa siendo eficaz contra el 90% de cepas de *N. meningitidis*.

Los autores de la invención también han encontrado que las composiciones inmunogénicas de ampollas anteriores de la invención, y sin duda cualquier composición inmunogénica de ampollas derivada de *Neisseria* (preferentemente gonocócica o meningocócica) puede tener un efecto potenciado de antígenos protectores (incluyendo LOS) en su superficie si ciertas combinaciones de proteínas de membrana externa inmunodominantes se regulan hacia menores niveles de expresión (y preferiblemente suprimidas). Por consiguiente un segundo aspecto de la invención es una preparación de ampollas de *Neisseria* derivada de una cepa de *Neisseria* que ha tenido 2 o más de las siguientes proteínas de membrana externa reguladas hacia menores niveles de expresión y preferiblemente suprimidas, comparada con la cepa nativa no modificada: PorA, PorB, OpA, OpC o PilC. Preferiblemente PorA y OpA, PorA y OpC, OpA y OpC, o PorA y OpA y OpC se regulan hacia menores niveles o se suprimen. La regulación hacia menores niveles (preferiblemente supresión) de expresión de FrpB se ha mostrado también que es beneficiosa potenciando el efecto de antígenos de protección cruzada particularmente en preparaciones de ampollas preparadas a partir de cepas de *Neisseria* desarrolladas en condiciones limitantes de hierro. Una ampolla de *Neisseria* derivada de una cepa con esta mutación es de este modo una realización adicional de la invención, como son ampollas derivadas de una combinación de la regulación hacia niveles menores de FrpB con una o más de las regulaciones hacia niveles menores mencionadas anteriormente. Dichas mutaciones son beneficiosas en cualquier cepa de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica) de la que las composiciones inmunogénicas de ampollas van a derivar, sin embargo se prefiere que se usen

las cepas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica) de inmunotipo L2 o L3. Preferiblemente las composiciones inmunogénicas de ampollas de la invención contienen tanto ampollas L2 como L3 donde al menos una (y preferiblemente ambas) son deficientes en las combinaciones anteriores de las proteínas de membrana externa inmunodominante (u OMP). Las técnicas para la regulación hacia niveles menores de estos genes se describen en el documento WO 01/09350 (incorporado en esta memoria descriptiva como referencia). Se conocen cuatro diferentes genes Opa que existen en el genoma meningocócico (Aho y col., 1991 Mol. Microbiol. 5: 1429 – 37), por lo tanto cuando se dice que Opa se regula hacia niveles menores de expresión quiere decir que preferiblemente 1, 2, 3 o (preferiblemente) los 4 genes presentes en meningococos se regulan también hacia niveles menores. Dicha regulación hacia niveles menores se puede realizar genéticamente como se describe en el documento WO 01/09350 o buscando y fácilmente encontradas, cepas naturales meningocócicas estables que tienen nula o baja expresión de los loci Opa. Dichas cepas se pueden encontrar utilizando la técnica descrita en Poolman y col., (1985 J. Med. Micro. 19: 203 – 209) donde las células que son Opa tienen un fenotipo diferente a la células que expresan Opa que se pueden ver mirando la aparición de las células en placas o en un microscopio. Una vez encontrada, la cepa se puede mostrar que es establemente Opa mediante la realización de una transferencia Western en contenidos celulares después de que se realiza una fermentación para establecer la carencia de Opa.

Seguridad de las composiciones inmunogénicas de LPS anteriores

Se ha cuestionado la seguridad de los anticuerpos surgidos de LPS L3 o L2 debido a la presencia de una estructura similar al grupo de oligosacáridos de lacto-N-neotetraosa (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-; figura 1) presentes en glicofingolípidos humanos. Incluso si un gran número de personas se ha vacunado seguramente con vacunas de vesículas extraídas con desoxicolato que

contienen una cantidad residual de LPS L3 (G. Bjune y col., Lancet (1991), 338, 1093 – 1096; GVG. Sierra y col., NIPH ann (1991), 14, 195 – 210), la supresión de la parte terminal de sacarídicos LOS es ventajosa en la prevención de cualquier reacción cruzada con estructuras presentes en la superficie de tejidos humanos. En una realización preferida, la inactivación del gen *lgtB* da como resultado una estructura intermedia de LPS en la que el residuo de galactosa terminal y el ácido siálico están ausentes (véase la figura 1 y 2, la mutación deja una estructura 4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1- en LOS L2 y L3). Dichos intermedios se podrían obtener en una cepa de LPS L3 y L2. Una versión alternativa y menos preferida (corta) del LPS se puede obtener desactivando el gen *lgtE*. Una versión alternativa adicional y menos preferida de los LPS se puede obtener desactivando el gen *lgtA*. Si se selecciona dicha mutación de *lgtA* se prefiere también desactivar la expresión de *lgtC* para evitar el inmunotipo L1 no inmunogénico que se forma.

Los mutantes *lgtB*⁻ se prefieren más ya que los inventores han encontrado que es el truncamiento óptimo para resolver la cuestión de seguridad mientras todavía mantienen un epítipo de oligosacárido protector de LPS que todavía puede inducir una respuesta de anticuerpo bactericida.

Por lo tanto, las preparaciones anteriores L2 o L3 (si están purificadas o en una ampolla aislada de las preparaciones de la invención o de ampollas meningocócicas se derivan en general ventajosamente de una cepa de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica) que se ha modificado genéticamente para regular hacia niveles menores permanentemente la expresión del producto génico funcional de *lgtB*, *lgtA* o el gen *lgtE*, preferiblemente inactivando el gen, más preferiblemente suprimiendo todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen.

Preferiblemente las cepas de *Neisseria* de la invención son deficientes en la síntesis del polisacárido capsular.

Cuando las preparaciones de ampollas de la invención se derivan de una cepa de meningococo B, se prefiere adicionalmente que también se elimine el polisacárido capsular (que también contiene las estructuras de sacáridos similares a las humanas). Aunque muchos genes se podrían inactivar para llevar a cabo esto, los inventores han mostrado ventajosamente que se prefiere que la cepa de producción de ampollas se modifique genéticamente para regular hacia niveles menores permanentemente la expresión del producto génico funcional del gen *siaD* (es decir, regulando hacia niveles menores la actividad de de α -2-8 polisialiltransferasa), preferiblemente inactivando el gen, más preferiblemente, suprimiendo todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen. Dicha inactivación se describe en el documento WO 01/09350. La mutación *siaD* (también conocida como *synD*) es la más ventajosa de muchas mutaciones que pueden dar como resultado la eliminación del epítipo similar al humano del polisacárido capsular, porque es una de las únicas mutaciones que no tienen efecto en la biosíntesis de los epitopos protectores de LOS, de esta manera siendo ventajosa en un procedimiento que pretende usar finalmente LOS como antígeno protector y tiene un efecto mínimo en el desarrollo de la bacteria. Un aspecto preferido de la invención es por lo tanto una preparación inmunogénica de ampollas como se ha descrito anteriormente que se deriva de una cepa mutante de meningococo B una *lgtE*⁻ *siaD*⁻, una *lgtA*⁻ *siaD*⁻ o preferiblemente una *lgtB*⁻ *siaD*⁻. La cepa en sí misma es un aspecto adicional de la invención.

Aunque la mutación *siaD*⁻ es preferible por las razones anteriores, se pueden utilizar otras mutaciones que inactivan la síntesis de polisacárido capsular de meningococo B. De este modo la cepa de producción de ampollas se puede modificar genéticamente para regular permanentemente hacia niveles menores la expresión del producto génico funcional de uno o más de los genes siguientes: genes *ctrA*, *ctrB*, *ctrC*, *ctrD*, *synA* (equivalente a *synX* y *siaA*), *synB* (equivalente a *SiaB*) o *synC* (equivalente a *siaC*). preferiblemente inactivando el gen, más

preferiblemente suprimiendo todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen. La mutación *lgtE*⁻ se puede combinar con una o más de estas mutaciones. Preferiblemente la mutación *lgtB*⁻ se combina con una o más de estas mutaciones. Un aspecto adicional de la invención es por lo tanto una preparación inmunogénica de ampollas como se ha descrito anteriormente que se deriva de dicha cepa mutante combinada de meningococo B. La cepa en sí misma es un aspecto adicional de la invención.

Se conoce en la técnica un locus de *Neisseria* que contiene varios genes *lgt*, incluyendo *lgtB* y *lgtE* y su secuencia (véase M. P. Jennings y col., *Microbiology* 1999, 145, 3013 – 3021 y las referencias citadas en esta memoria descriptiva y *J. Exp. Med.* 180: 2181 – 2190 [1994]).

Cuando LOS de longitud completa (no truncada) se va a utilizar en el producto final, es deseable para LOS que no se sialice (de este modo LOS genera una respuesta inmune contra las cepas de meningococo B invasivas, más peligrosas que también están sin sializar). En dicho caso es ventajoso el uso de una cepa negativa de cápsula que ha suprimido el gen *synA* (equivalente a *synX* y *siaA*), *synB* (equivalente a *siaB*) o *synC* (equivalente a *siaC*), de tal manera una mutación también produce LOS *menB* incapaz de ser sializados.

La toxicidad de LOS

Los LOS anteriormente purificados o composiciones inmunogénicas de ampollas de la invención también se pueden hacer menos tóxicas mediante la regulación hacia niveles menores de expresión de ciertos genes en la cepa de producción bacteriana de la que se derivan. Aunque dicha detoxificación puede ser no necesaria para inmunización intranasal con OMV de tipo nativo (J. J. Dabrick y col., *Vaccine* (2000), 18, 160 – 172), presentaría una ventaja para la detoxificación de la vacunación parenteral. Preferiblemente los LOS, LOS purificados o composiciones inmunogénicas de ampollas de la invención se

detoxifican genéticamente mediante ingeniería genética de la cepa de producción de *Neisseria* mediante mutación/modificación/inactivación de los genes implicados en la biosíntesis de LipidoA, particularmente los genes implicados en la adición de las cadenas de acilo secundarias al lípidoA, en particular mediante la regulación hacia niveles menores de la expresión del producto génico funcional de los genes *msbB* y/o *htrB* y preferiblemente mediante la inactivación del gen, más preferiblemente mediante la supresión de todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen. Alternativamente (o además) los LOS purificado o las composiciones inmunogénicas de ampollas se pueden derivar de una cepa de *Neisseria* que se ha modificado genéticamente de manera que uno o más de los siguientes genes se regulan hacia niveles mayores (mediante la introducción de un promotor más fuerte o integrando una copia extra del gen): *pmrA*, *pmrB*, *pmrE* y *pmrF*. Alternativamente (o además) los LOS purificados o las composiciones inmunogénicas de ampollas se pueden detoxificar mediante la adición de equivalentes funcionales peptídicos no tóxicos de polimixina B [una molécula con alta afinidad para LipidoA] a las composiciones.

Véase el documento WO 01/09350 para más detalle sobre los procedimientos de detoxificación anteriores y para las secuencias de promotor/génicas relevantes y los procedimientos de regulación hacia niveles mayores y regulación hacia niveles menores. Los genes *msbB* y *htrB* de *Neisseria* se llaman también *lpxL1* y *lpxL2*, respectivamente (véase el documento WO 00/026384) y las mutaciones de supresión de estos genes se caracterizan fenotípicamente por el mutante de LOS *msbB*⁻ que pierde una cadena acilo secundaria comparado con el tipo silvestre (y que mantiene la cadena acilo primaria 4 y secundaria 1), y el mutante de LOS *thrB*⁻ que pierde ambas cadenas de acilo secundarias. Dichas mutaciones se combinan preferiblemente con mutaciones para asegurar que la cepa de producción es deficiente en polisacárido capsular (véase más arriba) para asegurar la presentación óptima de LOS

detoxificados en la ampolla o para ayudar la purificación del LOS de subunidad detoxificada. Véanse los documentos WO 93/14115, WO 95/03327, Velucchi y col., (1997) J. Endotoxin Res. 4: 1 – 12 y el documento EP 976402 para detalles adicionales de equivalentes funcionales de péptidos no tóxicos de polimixina B que se pueden utilizar en las composiciones de esta invención – particularmente el uso del péptido SAEP 2 (de secuencia KTKCKFLKKC donde las dos cisternas forman un puente disulfuro).

Por "regulación hacia niveles menores de la expresión del producto génico funcional" se entiende que las adiciones, supresiones o sustituciones se realizan al promotor o la fase de lectura abierta del gen en cuestión de manera que la actividad biosintética del producto génico total se reduce (60, 70, 80, 90, 95 o más preferiblemente 100%). Evidentemente se pueden introducir mutaciones de desplazamiento de fase, o sustituirse promotores más débiles, sin embargo más preferiblemente la mayoría o toda la fase de lectura abierta y/o promotor se suprime para asegurar una regulación hacia niveles menores permanente del producto génico (activo) (como se describe en el documento WO 01/09350).

Los aspectos adicionales de la invención incluyen las cepas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica o gonocócica o meningocócica B) modificadas genéticamente descritas anteriormente de las que los LOS o preparaciones inmunogénicas de ampollas de la invención se pueden derivar.

Las preparaciones de LOS o de ampollas que contienen LOS de la invención

Un aspecto adicional de la invención son las preparaciones de LOS (particularmente las descritas anteriormente) aisladas de las cepas de *Neisseria* de la invención. Preferiblemente los LOS aislados (o ampolla que contiene LOS) es inmutotipo L2 o L3 y preferiblemente las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden ambas preparaciones de LOS (o ampolla) L2 y L3 de la

invención.

Dichas preparaciones también se pueden mejorar mediante la conjugación de la porción de oligosacárido de los LOS anteriores (si está purificada o presente en una preparación de ampollas) a un portador que comprende una fuente de epítomos de células T (de este modo obteniendo los LOS incluso un inmunógeno [T dependiente]). Una preparación de LOS purificada de la invención puede producir alternativamente (o además) un antígeno mejor presentándolo en formulaciones de liposomas conocidas en la técnica (véase por ejemplo el documento WO 96/40063 y las referencias citadas en esta memoria descriptiva.

El procedimiento de aislamiento de LOS a partir de bacterias se conoce bien en la técnica (véase por ejemplo, el procedimiento de agua – fenol en caliente de Wesphal y Jann [Meth. Carbo. Chem. 1965, 5: 83 - 91]). Véase también Galanos y col., 1969, Eur J. Biochem 9: 245 – 249, y Wu y col., 1987 Anal Bio Chem 160: 281 – 289. Se conocen también las técnicas para conjugar LOS aislado (véase por ejemplo el documento EP 941738 incorporado en esta memoria descriptiva como referencia).

Para los propósitos de esta invención "un portador que comprende una fuente de epítomos de células T" es usualmente un péptido o, preferiblemente, un polipéptido o proteína. Las técnicas de conjugación se conocen bien en la técnica. Los portadores típicos incluyen proteína D de no *H. influenzae* no caracterizable, toxoide de tétanos, toxoide de difteria y CRM197.

Las composiciones de LOS aisladas preferidas de la invención son: una composición que comprende LOS L2 y L3 aislados en los que la porción de oligosacárido de cada LOS se conjuga opcionalmente con un portador que comprende una fuente de epítomos de células T, una composición que comprende LOS que tiene una estructura consistente con la que se ha derivado de una cepa meningocócica IgT8⁻ en la que la porción de oligosacárido de cada LOS se conjuga opcionalmente con un portador que comprende una fuente de epítomos

de células T y más preferiblemente una composición que comprende una fuente de epítomos de células T y más preferiblemente una composición que comprende LOS L2 y L3 aislados que tienen una estructura consistente con ellos que se han derivado de una cepa meningocócica lgtB⁻ en las que la porción de oligosacárido de cada LOS se conjuga opcionalmente con un portador que comprende una fuente de epítomos de células T.

Preferiblemente las composiciones de LOS de la invención se han detoxificado. Esto se puede hacer mediante técnicas conocidas de tratamientos químicos de hidracina o hidrólisis alcalina que retiran las cadenas de acilo de la molécula (pero que pueden reducir la eficacia protectora de la molécula), pero se realiza preferiblemente mediante el aislamiento de LOS de un mutante meningocócico htrB⁻ o msbB⁻ (como se ha descrito anteriormente; particularmente en cepas de menos polisacáridos de las cápsulas), o mediante la adición de un equivalente funcional peptídico no tóxico de polimixina B [una molécula con alta afinidad a Lípido A] a la composición, en particular SAEP 2 (como se ha descrito anteriormente).

Los LOS de la invención se puede administrar en un estado aislado (usualmente en forma de micelas si el resto de lípido A está todavía intacto) o se puede administrar en un liposoma. En tal caso las proteínas de membrana externa se pueden añadir al liposoma y los LOS se pueden conjugar intra-liposoma a dichas proteínas de membrana externa para obtener el oligosacárido un antígeno T dependiente. Esto se puede realizar con una química similar a la reticulación de LOS intra-ampollas como se describe más adelante.

Reticulación (conjugación) intra- ampolla (de la porción de oligosacárido de LOS a las proteínas de membrana externa presentes en la superficie de la ampolla

Cuando LOS (en particular los LOS de la invención) está presente en una formulación de ampolla el LOS se conjuga preferiblemente *in situ* mediante

procedimientos que permiten la conjugación de LOS a una o más proteínas de membrana externa también presentes en la preparación de las ampollas (por ejemplo, PorA o PorB en meningococo).

Este procedimiento puede potenciar ventajosamente la estabilidad y/o inmunogenicidad (que proporciona auxiliar de células T) y/o antigenicidad del antígeno LOS dentro de la formulación de ampollas - proporcionando de esta manera auxiliar de células T para el inmunógeno de oligosacárido T-independiente en su conformación más protectora - como LOS en su ambiente natural en la superficie de membrana externa meningocócica. Además, la conjugación de los LOS dentro de la ampolla puede dar como resultado una detoxificación de los LOS (estando al porción de lípido A establemente enterrada en la membrana externa estando así menos disponible para ocasionar toxicidad). De este modo los procedimientos de detoxificación mencionados anteriormente de aislamiento de ampollas a partir de mutantes *htrB*⁻ o *msbB*⁻ o mediante la adición de equivalente funcional peptídico no tóxico de polimixina B a la composición pueden no requerirse (pero que se pueden añadir en combinación para la seguridad adicional). De este modo los inventores han encontrado que una composición que comprende ampollas en la que LOS presente en las ampollas se ha conjugado con una forma intra- ampolla a las proteínas de membrana externa también presentes en la ampolla puede formar la base de una vacuna para el tratamiento o prevención de enfermedades ocasionadas por el organismo a partir del cual se han derivado las ampollas, siendo dicha vacuna sustancialmente no tóxica y es capaz de inducir una respuesta bactericida T dependiente contra LOS en su ambiente nativo.

Por lo tanto esta invención proporciona además una preparación de ampollas conjugada a LOS intra-ampolla. Preferiblemente las ampollas se han derivado de cualquier organismo Gram negativo a partir de las que se pueden producir las ampollas (véase el documento WO 01/09350), preferiblemente

Moxarella catarrhalis, *Haemophilus influenzae* no caracterizable o *Neiseria* (más preferiblemente meningococo).

Dichas preparaciones de ampollas se pueden aislar a partir de la bacteria en cuestión (véase el documento WO 01/09350) y después se somete a procedimientos químicos de conjugación conocidos a grupos de unión (por ejemplo, NH_2 o COOH) en la porción de oligosacárido de LOS a grupos (por ejemplo, NH_2 o COOH) en las proteínas de membrana externa de la ampolla. Se pueden usar las técnicas de reticulación que utilizan glutaraldehído, formaldehído o mezclas de glutaraldehído/formaldehído, pero se prefiere que se usen las técnicas químicas más selectivas tales como EDAC o EDAC/NHS (J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water soluble carbodiimide – mediated coupling reactions. *Analytical chemistry* 156: 220 – 222 (1986); y *Bioconjugates Techniques* : GregT. Hermanson (1996) pp. 173 – 176). Otras técnicas químicas de conjugación o tratamientos capaces de crear enlaces covalentes entre LOS y moléculas de proteínas que se podrían usar se describen en el documento EP 941738.

Preferiblemente las preparaciones de ampollas se conjugan en ausencia de polisacárido capsular. Las ampollas se pueden aislar a partir de una cepa que no produce polisacárido capsular (naturalmente o mediante mutación), o se pueden purificar a partir de la mayoría y preferiblemente todos los polisacáridos capsulares contaminantes. De esta forma, la reacción de conjugación de LOPS intra-ampolla es mucho más eficaz.

Preferiblemente mas que 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ó 95% de LOS presentes en las ampollas está reticulados/conjugados.

Cuando las ampollas conjugadas intra-ampolla se derivan de meningococo, se prefiere que la cepa a partir de la cual se derivan sea un mutante que no puede producir polisacárido capsular (por ejemplo, una de las cepas de mutantes descritas anteriormente, en particular siaD). También se

prefiere que las composiciones inmunogénicas eficaces contra la enfermedad meningocócica comprendan tanto una ampolla L2 como L3, en las que LOS L2 y L3 se conjugan ambos con las proteínas de membrana externa de las ampollas. Además, se prefiere que la estructura LOS dentro de la ampolla conjugada intra-ampolla sea consistente con la que se ha derivado de una cepa meningocócica *lgtB⁻*. Más preferiblemente composiciones inmunogénicas comprenden ampollas conjugadas intra-ampolla: derivadas de una cepa meningocócica mutante que no puede producir polisacárido capsular y es *lgtB⁻*; comprendiendo ampollas de L2 y L3 derivadas de cepas meningocócicas mutantes que son *lgtB⁻* o más preferiblemente comprendiendo ampollas de L2 y L3 derivadas de cepas meningocócicas mutantes que no pueden producir polisacárido capsular y son *lgtB⁻*.

La típica cepa meningocócica L3 que se puede usar en la presente invención es la cepa H44/76 *menB*. Una cepa típica de L2 es la B16B16 *menB* o la cepa meningocócica 39E tipo C o la cepa 760676.

Como se ha indicado anteriormente las ampollas de la invención se han detoxificado a un grado mediante el acto de conjugación y no necesitan detoxificarse posteriormente, sin embargo para seguridad adicional se puede utilizar procedimientos adicionales de detoxificación, por ejemplo usando ampollas derivadas de una cepa meningocócica que es *htrB⁻* o *msbB⁻* o añadiendo un equivalente péptido funcional no tóxico de polimixina B [una molécula con alta afinidad a Lípido A] (preferiblemente SEAP 2) a la composición de ampollas (como se ha descrito anteriormente). La conjugación de LOS (particularmente en una manera intra-ampolla) muestra de este modo sorprendentemente una menor toxicidad de LOS comparada con las preparaciones que comprenden la misma cantidad de LOS no conjugado. De este modo un procedimiento para detoxificar ampollas se proporciona adicionalmente por medios de conjugación intra-ampolla de LOS a la proteína de membrana externa de las ampollas.

En la anterior forma se proporcionan las ampollas meningocócicas y composiciones inmunogénicas que comprenden ampollas que tienen como un LOS de antígeno importante que es sustancialmente no tóxico, desprovisto de problemas de autoinmunidad, tiene un carácter T-dependiente, está presente en su ambiente natural y es capaz de inducir una respuesta de anticuerpo bactericida contra más del 90% de cepas meningocócicas (en el caso de composiciones de L2 + L3).

Uno o más de polisacáridos capsulares de Men A, C, Y o W u oligosacáridos (preferiblemente al menos MenC, o MenA y MenC, o Men C y MenY) se pueden también conjugar en una proteína de membrana externa de la ampolla de la invención también. Aunque esto se podría hacer en la misma reacción como reticulación de LOS, se prefiere que se haga en una reacción separada.

El procedimiento de conjugación de LOS intra-ampolla óptimo es un aspecto adicional de la presente invención.

La conjugación intra-ampolla debe incorporar 1, 2 ó 3 de las siguientes etapas de procedimiento: el pH de la conjugación debe ser mayor pH 7,0, preferiblemente mayor o igual que pH 7,5 (más preferiblemente inferior a pH 9); condiciones de 1 – 5% preferiblemente 2 – 4% más preferiblemente alrededor de 3% de sacarosa se debe mantener durante la reacción; NaCl se debe minimizar en la reacción de conjugación, preferiblemente por debajo de 0.1 M, 0,05 M, 0,01 M, 0,005 M, 0,001 M y más preferiblemente no presente en absoluto. Todas estas características del procedimiento aseguran que las ampollas permanezcan estables y en solución durante todo el procedimiento de conjugación.

El procedimiento de conjugación EDAC/NHS es un procedimiento preferido para la conjugación intra-ampolla. EDAC/NHS se prefiere a formaldehído que puede reticular a demasiada altura una extensión de este modo afectando adversamente a la filtrabilidad. EDAC reacciona con ácidos carboxílicos para

crear un intermedio éster activo. En presencia de un nucleófilo de amina, se forma un enlace de amida con liberación de un subproducto de isourea. Sin embargo, la eficacia de una reacción mediada por EDAC se puede incrementar mediante la formación de un intermedio de éster Sulfo-NHS. El éster de Sulfo-NHS sobrevive en solución acuosa más tiempo que el éster activo formado a partir de la reacción de EDAC solo con un carboxilato. De este modo rendimientos más altos de la formación de enlace de amida se pueden realizar usando este procedimiento en dos etapas. La conjugación de EDAC/NHS se describe en J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodimida-mediated coupling reactions. *Analytical chemistry* 156: 220 – 222 (1986); y Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173 – 176. Preferiblemente se usa en la reacción 0,01 – 5 mg de EDAC por mg de ampolla, preferiblemente 0,05 - 1 mg de EDAC por mg de ampolla. La cantidad de EDAC usada depende de la cantidad de LOS presente en la muestra que a su vez depende del porcentaje de DOC usado para extraer las ampollas. A bajo porcentaje de DOC, se usan altas cantidades de EDAC (i mg/g y más), sin embargo a alto porcentaje de DOC, se utilizan menos cantidades de EDAC (0,05 – 0,1 mg/mg) para evitar demasiada reticulación inter-ampollas.

Por lo tanto, un procedimiento preferido de la invención es un procedimiento para producir LOS conjugado a intra-ampolla (preferiblemente meningocócica) que comprende las etapas conjugar ampollas en presencia de EDAC/NHS a un pH entre 7,0 y pH 9,0 (preferiblemente alrededor de pH 7,5) en 1 – 5% (preferiblemente alrededor 3%) de sacarosa y opcionalmente en condiciones sustancialmente desprovistas de NaCl (como se ha descrito anteriormente) y aislar las ampollas conjugadas de la mezcla de reacción.

A la reacción puede seguir geles de separación de Western de la mezcla de reacción usando anti-LOS (por ejemplo, anti-L2 o anti L3) mAbs para mostrar el incremento de peso molecular de LOS para una mayor proporción de LOS en

las ampollas a medida que transcurre el tiempo de reacción.

Se pueden recuperar 99% de ampollas usando dichas técnicas.

Se encontró que EDAC es un agente de reticulación intra-ampollas excelente porque reticuló LOS a OMP suficientemente para mejorar la inmunogenicidad T-dependiente de LOS, pero no lo reticuló a tal alto grado que se produjeron los problemas tales como escasa filtrabilidad, agregación y reticulación intra-ampolla. La morfología de las ampollas generadas es similar a la de las ampollas no conjugadas. Además, el protocolo anterior evitaba que tuviese lugar una demasiada reticulación (que puede disminuir la inmunogenicidad de las OMP protectoras presentes naturalmente en la superficie de la ampolla por ejemplo TbpA o Hsf).

Técnicas para aislar ampollas

Las vesículas de membrana externa (abreviadamente OMV o ampollas) se pueden aislar mediante muchas técnicas conocidas (Frediksen y col., NIPH Annals (1991), 14, 67 – 79; Zollinger y col., J. Clin Invest (1979), 63, 836 – 848; Saunders y col., Infect Immun (1999), 67, 113 – 119; J. J. Drabick y col., Vaccine (1999), 18, 160 – 172). Éstos se dividen en dos grupos principales de técnicas que usan desoxicolato (alrededor de 0,5%) para extraer ampollas de meningococo y técnicas que usan bajos niveles de desoxicolato (abreviadamente DOC) o nada de desoxicolato en absoluto. El DOC libre que produce ampollas tiene la característica interesante de mantener alto nivel de LOS en las OMV que es ventajoso en una vacuna donde LOS es un antígeno protector. Comparadas con las ampollas extraídas con DOC la concentración de L3 Ags en OMV obtenida mediante un procedimiento exento de DOC es aproximadamente diez veces más alta. Por esta razón se prefiere un procedimiento exento de detergente (preferiblemente exento de DOC) de preparación de ampollas para los propósitos de los procedimientos de esta invención, aunque la extracción con un tampón que

contiene bajos niveles de detergente (preferiblemente DOC) puede también ser ventajosa en que la etapa dejaría la mayoría de LOS que interacciona estrechamente en la ampolla mientras que elimina cualquier LOS más tóxico flojamente retenido. Típicamente 0 – 0,5% y preferiblemente 0,02 – 0,4%, 0,04 3% ó 0,06 – 2% de detergente (preferiblemente DOC) se utiliza para la extracción de ampollas, más preferiblemente 0,08 – 0,15% y más preferiblemente alrededor de o exactamente 0,1% se utiliza para obtener una cantidad óptima de LOS para estar establemente presente en las ampollas. Los procedimientos de extracción exentos de DOC (o bajos en DOC) se prefieren particularmente cuando los LOS se han detoxificado mediante uno o más de los procedimientos detallados anteriormente.

Composiciones de vacunas

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden formular fácilmente en forma de composiciones de vacunas mediante la adición de un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un procedimiento para fabricar las composiciones inmunogénicas de *Neisseria* (preferiblemente meningocócica) o vacunas de la invención se proporciona adicionalmente comprendiendo las etapas de aislar LOS purificados de la invención (preferiblemente L2 o L3) como se ha descrito anteriormente o producir ampollas aisladas de la invención (preferiblemente con un inmutipo L2 o L3) como se ha descrito anteriormente y formular los LOS o ampollas con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente LOS purificados o ambos inmutipos L2 y L3 de la invención, o ampollas de ambos inmutipos L2 y L3 de la invención, o un LOS purificado de L2 y una ampolla de L3 (o viceversa), se combinan en una etapa de mezcla. Preferiblemente los LOS purificados o ampolla de la invención se han conjugado como se ha descrito anteriormente después del aislamiento. También se puede añadir una etapa

adicional de formulación de liposomas para los LOS purificados (usando técnicas conocidas en la técnica, véase por ejemplo el documento WO 96/40063 y referencias citadas en esta memoria descriptiva). Preferiblemente las preparaciones de ampollas se aíslan mediante extracción con concentraciones bajas (o sin) de DOC (como se ha descrito anteriormente).

Dichos procedimientos de combinación de L2 y L3 pueden producir una vacuna que es eficaz contra casi todas las cepas de meningococos B.

Las composiciones inmunogénicas anteriores (o procedimientos) pueden tener añadidos uno o más (2, 3 ó 4) polisacáridos u oligosacáridos meningocócicos (bien puros o conjugados a un portador que comprende epítomos de células T, como se ha descrito anteriormente) de serogrupos A, C, Y o W a la composición. Preferiblemente al menos se añade C (más preferiblemente conjugado) y más preferiblemente A y C o Y y C (preferiblemente todos conjugados) y más preferiblemente A, C, o Y y W (preferiblemente todos conjugados). Ventajosamente un polisacárido u oligosacárido capsular B de *H. influenzae* también se incluye en las composiciones anteriores para genera una vacuna de meningitis universal.

Preferiblemente las composiciones que consisten en o que comprenden composiciones específicamente individualizadas en el documento WO 94/08021 no se reivindican en la presente invención.

Formulaciones de vacunas de la invención

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden formular con un adyuvante adecuado para generar composiciones de vacunas de la invención.

Los adyuvantes adecuados comprenden una sal de aluminio tal como gel hidróxido de aluminio (abreviadamente alud) o fosfato de aluminio (preferiblemente hidróxido de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio (particularmente carbonato cálcico), hierro o cinc, o puede ser una suspensión

insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, catiónica o aniónicamente polisacáridos derivatizados, o polifosfazenos.

Los sistemas adyuvantes adecuados de Th1 que se pueden añadir incluyen lípido A monofosforilo, particularmente lípido A monofosforilo de 3-de-O-acilado (u otros derivados de LPS no tóxicos) y una combinación de lípido A monofosforilo, preferiblemente lípido A monofosforilo de 3-de-O-acilado (abreviadamente 3D-MPL) [o derivados de LPS no tóxicos] junto con una sal de aluminio (preferiblemente fosfato de aluminio. Un sistema potenciado implica la combinación de un lípido A monofosforilo y un derivado de saponina particularmente la combinación de QS21 [u otra saponina] y 3D-MPL [o un derivado de LPS no tóxico] como se describe en el documento WO 94/00153 o una composición menos reactogénica donde la QS21 [o saponina] se inactiva con colesterol como se describe en el documento WO96/33739. Una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO95/17210 y es una formulación preferida que también puede añadirse. Otros adyuvantes que también se pueden añadir comprenden una saponina, más preferiblemente QS21 y/o una emulsión de aceite en agua y tocoferol. También se puede añadir oligonucleótidos que contienen CpG sin metilar (documento WO 96/02555).

La preparación de vacunas se describe generalmente en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach"(eds Powell M. F. y Newman M. J.) (1995) Plenum Press Nueva York).

Una dosis inmunoprotectora de vacunas se puede administrar mediante la vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir las vías de inyección intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante la administración a la mucosa a los tractos oral/alimentario (preferiblemente administración intranasal), respiratoria, genitourinaria. Típicamente la cantidad de ampolla en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce

una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo del tipo de inmunógeno específico utilizado y como se presenta. Generalmente se espera que cada dosis comprenderá 1 – 100 µg de cada ampolla, preferiblemente 5 – 50 µg y más típicamente en el intervalo 5 – 25 µg.

Mejoras adicionales a las composiciones inmunogénicas de las ampollas de la invención

Las composiciones de ampollas anteriores de la invención se pueden mejorar adicionalmente en eficacia en vacunas de la invención si la cepa de *Neisseria* de las que se derivan (incluyendo gonococos y preferiblemente meningococos, más preferiblemente *H. meningitidis B*) tienen uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) regulados hacia niveles mayores mediante la inserción de copias adicionales del gen en el genoma, o introduciendo un promotor más fuerte hacia arriba del gen existente, o cualquiera de las otras formas descritas en el documento WO 01/09350 que son capaces de inducir cepas modificadas para fabricar sobre 1,2, 1,5, 2, 3, 5 ó 10 veces el nivel de antígeno comparado con la cepa no modificada: NspA (documento WO 96/29412), Hsf o truncados de los mismos (documentos WO 99/31132 y WO 01/55182; también conocido como NhhA), Hap (documento PCT/E99/02766) OMP85 (documento WO 00/23595, PilQ (documento PCT/E99/03603), PldA (documento PCT/EP99/03603), FrpB (documento WO 96/31618), TbpA (documentos WO92/03467, US59112336, WO93/06861 y EP586266), TbpB (documentos WO93/06861 y EP586266), NadA (Comanducci y col., J. Exp. Med 2002 195; 1445 – 1454), FrpA/FrpC o porciones en común entre estos antígenos que implican 5 o más secuencias repetidas (documento WO 92/01460; Thompson y col., (1993) J. Bacteriol. 175: 811 – 818; Thompson (1993) Infect. Immun. 61: 2906 – 2911), LbpA, LbpB (documento PCT/EP98/05117), FhaB (documento

WO98/02547 SEC ID N° 38 [nucleótidos 3083 - 9025]), HasR (documento PCT/EP99/05989), lipo02 (documento PCT/EP99/08315), Tbp2 (documento WO 99/57280), MltA (documento WO 99/57280), TspA (documento WO 00/03003), TspB (documento WO 00/03003) y ctrA (documento PCT/EP00/00135). Donde Hsf se menciona en esta memoria descriptiva, el término puede ser sustituible en cada caso por truncados de Hsf, en particular los descritos en WO 01/55182.

Se prefiere particularmente si tanto Hsf como TbpA (formas de peso molecular bajo o alto, o ambos bajos y altos [documento EP 586266], o Hsf y OMP85, u OMP85 y TbpA (formas de peso molecular bajo o alto, o ambos bajos y altos), o NspA y Hsf, o NspA y OMP85, o NspA y TbpA (formas de peso molecular bajo o alto, o ambos bajos y altos) están ambos regulados hacia niveles mayores. Donde 2 ampollas están comprendidas en la composición, se prefiere que cada ampolla tenga diferentes regulaciones hacia niveles mayores. Si TbpA alto y bajo se van a regular hacia niveles mayores, se prefiere que estos regulan hacia niveles mayores en dos ampollas separadas presentes en la composición derivada de 2 cepas que comprenden naturalmente las 2 formas de TbpA. Más preferiblemente, las dos cepas tienen inmunotipos de LOS L2 y L3. TbpA se puede regular hacia niveles mayores genéticamente o mediante desarrollo de las cepas de producción de *Neisseria/meningocócica* en condiciones limitadas de hierro por ejemplo en presencia de 50 – 70 μ M de Desferal (mesilato de deferoxamina, disponible de Sigma). Si se toma el último planteamiento, se prefiere que el gen de expresión de FrpB se regule hacia niveles menores (preferiblemente suprimido) ya que este antígeno variable puede hacerse inmunodominante en ampollas aisladas de cepas meningocócicas aisladas en condiciones limitadas y hierro.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende una ampolla de L3 de un "msbB" de polisacárido capsular de lgtB" preferiblemente regulado hacia niveles mayores en TbpA alto y Hsf y una ampolla de L2 de un "

msbB⁻ de polisacárido capsular de lgtB⁻ preferiblemente regulado hacia niveles mayores en TbpA bajo y Omp85. Más preferiblemente ambas ampollas están adicionalmente reguladas hacia niveles menores de expresión de PorA y/o FrpB y opcionalmente la expresión de OpC y/o OpA. Las ampollas se aíslan más preferiblemente mediante un procedimiento de DOC bajo como se ha descrito anteriormente y el LOS en ambas ampollas está reticulado intra-ampolla a la proteína de membrana externa.

Vacunas de células fantasma o enteras muertas

Los inventores contemplan que las composiciones y vacunas anteriores concernientes a las ampollas se pueden fácilmente extender a procedimientos que conciernen a las preparaciones y vacunas de células fantasmas o enteras muertas (con idénticas ventajas). Los procedimientos para fabricar preparaciones fantasma (células vacías con envolturas intactas) de cepas Gram negativas se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo el documento WO 92/01791). Los procedimientos para matar células enteras para fabricar preparaciones de células inactivadas para uso en vacunas también se conocen bien. Por lo tanto las composiciones y vacunas que implican ampollas descritas en todo este documento se contemplan para ser aplicables a las mismas composiciones o vacunas que comprenden preparaciones equivalentes de células fantasma y muertas enteras de la invención.

Ensayo bactericida en suero

El ensayo bactericida en suero es el procedimiento preferido para valorar relaciones sinérgicas entre antígenos cuando se combinan en una composición inmunogénica de la invención.

Tal respuesta sinérgica se puede caracterizar mediante el SBA provocado por la combinación de antígenos que son al menos 50%, dos veces, tres veces

preferiblemente cuatro veces, cinco veces, seis veces siete veces, ocho veces, nueve veces y más preferiblemente diez veces más alto que el SBA provocado por cada antígeno separadamente. Preferiblemente SBA se mide contra una cepa homóloga de la que se derivan los antígenos y preferiblemente también contra un panel de cepas heterólogas. (Véase más adelante para un panel representativo por ejemplo BZ10 (B:2b:P1,2) que pertenecen al grupo A-4; B16B6 (B2a:P1,2) perteneciente al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1,7, 16)). SBA es el marcador inmunológico comúnmente acordado para estimar la eficacia de una vacuna meningocócica (Perkins y col., J. Infect Dis. 1998, 177: 683 – 691). SBA se puede averiguar satisfactoriamente mediante cualquier procedimiento conocido. SBA se puede llevar a cabo usando sueros obtenidos de modelos de animales o de sujetos humanos.

Un procedimiento preferido de manejar SBA con sueros humanos es el siguiente. Se toma una muestra de sangre antes a la primera vacunación, dos meses después de la segunda vacunación y un mes después de la tercera vacunación (tres vacunaciones en un año siendo un programa de vacunación principal humana administrada en, por ejemplo, 0, 2 y 4 meses, ó 0, 1 y 6 meses. Tales programas de vacunación principal humana se pueden llevar a cabo en niños de un año de edad (por ejemplo al mismo tiempo como se llevan a cabo las vacunaciones con Hib) o de 2 – 4 años de edad o adolescentes también se pueden vacunar para el SBA de ensayo con dicho programa de vacunación principal. Una muestra adicional de sangre se puede tomar 6 a 12 meses después de la vacunación principal y un mes después de la dosis de refuerzo, si es aplicable.

SBA será satisfactorio para un antígeno o preparación de ampollas con actividad bactericida homóloga si un mes después de de la tercera dosis vacuna (del programa de vacunación principal) (en niños de 2 – 4 años de edad o adolescentes, pero preferiblemente en niños en el primer año de vida) el

porcentaje de sujetos con un crecimiento cuatro veces en términos de título de SBA (dilución de anticuerpo) (comparado con el título de prevacunación) contra la cepa de meningococo de la que los antígenos de la invención se derivaban es mayor que 30%, preferiblemente mayor que 40%, más preferiblemente mayor que 50% y más preferiblemente mayor que el 60% de los sujetos.

Ciertamente un antígeno o preparación de ampollas con actividad bactericida heteróloga también puede constituir preparación de ampollas con actividad bactericida homóloga si puede también provocar SBA satisfactoria contra la cepa meningocócica de la que se deriva.

SBA será satisfactorio para un antígeno o preparación de ampollas con actividad bactericida heteróloga si un mes después de la tercera dosis de vacuna (del programa de vacunación principal) (en niños de 2 – 4 años de edad o adolescentes, pero preferiblemente en niños en el primer año de vida) el porcentaje de sujetos con un crecimiento cuatro veces en términos de título de SBA (dilución de anticuerpo) (comparado con el título de prevacunación) contra tres cepas heterólogas de meningococo es mayor que 20%, preferiblemente mayor que 30%, más preferiblemente mayor que 35% y más preferiblemente mayor que 40% de los sujetos. Tal ensayo es una buena indicación de si el antígeno o preparación de ampollas con actividad bactericida heteróloga puede inducir anticuerpos bactericidas cruzados contra diversas cepas meningocócicas. Las tres cepas heterólogas deben preferiblemente tener complejo de tipo electroforético (abreviadamente ET) o configuración de tipo de secuencias multilocus (abreviadamente MLST) (véase Maiden y col., PNAS Estados Unidos 1998, 95: 3140 – 5) a cada otra y preferiblemente a la cepa de la que el antígeno o preparación de ampollas con actividad bactericida heteróloga se fabrica o deriva. Una persona experta será capaz de determinar fácilmente tres cepas con complejo ET diferente que reflejan la diversidad genética observada entre meningococos, particularmente entre cepas de meningococo de tipo B que se

reconocen que son la causa de la carga de enfermedad significativa y/o que representan líneas hipervirulentas de MenB reconocidas (véase Maiden anteriormente). Por ejemplo tres cepas que se podrían utilizar son las siguientes: BZ10 (B:2b:P1,2) perteneciente al grupo A-4; B16B6 (B:2b:P1,2) perteneciente al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1,7, 16) perteneciente al complejo ET-5, o cualquiera otra cepa perteneciente al mismo grupo ET. Dichas cepas se pueden usar para ensayar un antígeno o preparación de ampollas con actividad bactericida heteróloga fabricada o derivada de, por ejemplo, la cepa meningocócica CU385 (B:4:P1,5) que pertenece al complejo ET-5. Otra cepa de muestra que se podría utilizar es del clon epidémico de la línea 3 (por ejemplo NZ124 [B:4:P1,7, 4]. Otra cepa de ET-37 es NGP165 (B:2a:P1,2).

Los procedimientos para medir la actividad de SBA se conocen en la técnica. Por ejemplo un procedimiento que podría usarse se describe en el documento WO 99/09176 en el ejemplo 10C. En términos generales, un cultivo de la cepa a ensayarse se desarrolla (preferiblemente en condiciones de supresión de hierro mediante adición de un agente quelante de hierro tal como EDDA al medio de crecimiento) en la fase logarítmica de crecimiento. Esto se puede suspender en un medio con BSA (tal como medio de Hanks con BSA al 0,3%) con el fin de obtener una suspensión de células de trabajo ajustada a aproximadamente 20000 UFC/ml. Una serie de mezclas de reacción se pueden preparar mezclando una serie de diluciones dos veces de sueros a ensayarse (preferiblemente inactivados por calor a 56°C durante 30 minutos) [por ejemplo en un volumen de 50 µl/pocillo] y la suspensión a ensayarse de la cepa meningocócica de 20000 UFC/ml [por ejemplo en un volumen de 25 µl/pocillo]. Los viales de la reacción se deben incubar (por ejemplo 37°C durante 15 minutos) y agitarse (por ejemplo a 210 rpm). La mezcla final de reacción [por ejemplo en un volumen de 100 µl] adicionalmente contiene una fuente de complemento [tal como 25% de volumen final de suero de conejo pequeño preensayado, o suero humano

para serología humana] y se incuba como antes [por ejemplo 37°C durante 60 minutos]. Se puede usar para este ensayo una placa de microtitulación de fondo en U de 96 pocillos de poliestireno estéril. Una alícuota [por ejemplo 10 µl] se puede tomar de cada pocillo usando una pipeta multicanal y gotearse en placas de agar de Mueller – Hinton (conteniendo preferiblemente 1% de Isovitalex y 1% de suero de caballo inactivado por calor) e incubadas (por ejemplo durante 18 horas a 37°C en CO₂ al 5%). Preferiblemente, se pueden contar colonias individuales hasta 80 UFC por alícuota. Las siguientes tres muestras de ensayo se pueden utilizar como controles: tampón + bacterias + complemento; tampón + bacterias + complemento inactivado; suero + bacterias + complemento inactivado. Los títulos de SBA se pueden calcular sencillamente usando un programa que procesa los datos para dar una medida de la dilución que corresponde al 50% de muerte celular mediante un cálculo de regresión.

Todas las referencias de solicitudes de patente citadas en esta memoria descriptiva de la patente se incorporan como referencia en esta memoria descriptiva.

EJEMPLOS

Los ejemplos citados más adelante se llevan a cabo usando técnicas convencionales, que se conocen bien y rutinariamente por los expertos en la técnica, excepto donde de otra manera se describe en detalle. Los ejemplos son ilustrativos pero no limitan la invención.

Ejemplo 1

Los ejemplos describen genes de supresiones que codifican proteínas implicadas en la producción de polisacáridos capsulares B de meningococo B, la supresión del gen PorA, la regulación hacia niveles mayores de diversas proteínas de membrana externa en la superficie de ampollas meningocócicas, la

regulación hacia niveles menores de proteínas inmunodominantes o enzimas biosintéticas y procedimientos para aislar ampollas se describen en el documento WO 01/09350.

Ejemplo 2: LOS: un antígeno protector cruzado clave

Para valorar el papel de LOS como un antígeno protector cruzado potencial, cepa de meningococo B H44/76 de tipo salvaje (abreviadamente WT) (que expresa LOS L3) y una cepa H44/76 modificada que expresa un "LOS de tipo galE" (con una estructura corta como para un LOS lgtE) se usaron para producir ampollas según dos procedimientos diferentes. El primer procedimiento usaba 0,1% de DOC con el fin de tener altos niveles de LOS en ampollas, el segundo usaba 0,5% de DOC para tener bajos niveles de LOS en las ampollas resultantes.

Los ratones recibieron tres inyecciones (el día 0, 21 y 28) por vía IM de 5 µg de ampollas adsorbidas en sales de Al^{3+} (fosfato de aluminio) y 3D-MPL por dosis. Se tomaron muestras de sangre 14 días después de la tercera inyección.

ELISA de LOS anti-L3 se hizo de en suero combinado y usando LOS L3 purificado. Los resultados en la figura 3A muestran claramente que el procedimiento con 1% de DOC producía ampollas capaces de provocar una respuesta anti - LOS en ratones. Esto demuestra que LOS galE y LOS L3 son capaces de inducir la producción de anticuerpos. Por otra parte 0,5% de DOC extraía demasiado LOS con el fin para él de actuar como un antígeno clave en la vacuna de ampollas.

Ensayos bactericidas de suero

SBA se realizó en sueros individuales usando diferentes cepas de NmenB: la cepa WT H44/76 homóloga, una cepa PorA(-) H44/76 y dos cepas heterólogas

(basadas en subtipo suero) Cu385 y NZ124. Estas cuatro cepas expresan un LOS L3. Se añade una quinta cepa. Comparada con H44/76, esta cepa (B16B6) es heteróloga no solamente para PorA sino también para LOS (es una cepa de inmunotipo L2).

Los resultados en la figura 3B una respuesta bactericida cruzada solamente cepas L3 pero solamente con las ampollas de 0,1% de DOC WT. No se observó respuesta bactericida cruzada para ampollas gal E⁻ de 0,1% de DOC y ampollas WT de 0,5% de DOC. Además, se conoce bien que la respuesta bactericida inducida por anticuerpos PorA es serotipo dependiente. Esto también se observó en esta experimento con bien ampollas WT de 0,5% de DOC o ampollas de galE⁻ y también con datos de SBA hechos con la cepa PorA(-) H44/76.

Todos estos resultados sugieren que la respuesta bactericida cruzada inducida por ampollas que contienen alto porcentaje de LOS L3 se debe a la producción de Abs dirigida contra el antígeno LOS.

Solamente el LOS L3 (y no el LOS galE⁻) es capaz de provocar la producción de anticuerpos bactericidas. Aunque, en ELISA se observó una buena respuesta anti – LOS con ampollas galE⁻ de 0,1% de DOC, esta respuesta no es biológicamente relevante (no SBA).

Además parece también que la respuesta es específica de inmunotipo de LOS como Abs LOS anti-L3 matan solamente las cepas L3 pero no las cepas L2, indicando que una vacuna óptima debe contener idealmente LOS L3 y L2 para cobertura óptima.

Experimento de supresión

Con el fin de demostrar que la respuesta inducida por ampollas WT de DOC al 0,1% se debe principalmente a los anticuerpos anti-LOS, combinaciones de suero se agotaron con diferentes concentraciones de LOS L3 purificado.

Después del agotamiento se usaron sueros en un ensayo bactericida contra la cepa homóloga WT H44/76.

Los resultados obtenidos (véase la figura 3C) con sueros activados contra ampollas WT de 0,1% de DOC muestran una clara inhibición de dosis - intervalo, demostrando que la mayoría de los anticuerpos inducidos por esta preparación se dirigen contra LOS (confirmando los resultados de SBA generados con la cepa PorA(-) H44/76. En contraste, la respuesta inducida por WT 0,5% de DOC no se dirige contra LOS como se demuestra por SBA hecho con la cepa PorA(-) H44/76 y también indicada por agotamiento de LOS.

Este resultado se mantiene probablemente para LOS L2.

Ejemplo 3: Experimentos con ampollas de L3 e intermedio (*lgtB*⁻) exentas de DOC (LOS no detoxificado) inducía anticuerpos bactericida cruzada

La cepa derivada de meningococos MC58 usada es B:P,7,16, *opc*⁻, *siaD*⁻. Esta cepa se modificó genéticamente para expresar bien L3 (cepa 2G2) o un epítipo intermedio (cepa 2G EcoN1b-1, como 2G2 pero adicionalmente *lgtB*⁻) o un LPS en versión corta (cepa C6, que es *lgtE*⁻). OMV se produjeron según bien un procedimiento de DOC (0,5%) de altura normal o procedimiento exento de DOC.

Se inmunizaron ratones (10 por grupo) tres veces mediante la vía intramuscular el día 0, 20 y 28. Recibían 1 ó 10 µg (contenido en proteína) de ampollas formuladas en Al(OH₃) Se tomaron muestras de sangre el día 28 (posición II) y día 42 (posición III).

Se hicieron ensayos bactericidas en sueros combinados y utilizando cepas homólogas (MC58 y H44/76) y dos cepas heterólogas (M97250687 y M972078) con suero de conejo pequeño como fuente de complemento exógeno.

La siguiente tabla resume los resultados (títulos bactericidas para 50% de muerte:

		Cepa y serotipo			
Antígeno	Muestras de sangre	MC58 P1,7,16	H44/76TT P1,7,16	M97250687 P1,18,15	M97252078 P1,A
c6 no doc 10 ug IM	Posición II	> 2560	> 2560	> 2560	98
c6 no doc 10 ug IM	Posición III	1353	> 2560	> 2560	90
c6 no doc 1 ug IM	Posición II	247	620	247	< 20
c6 no doc 1 ug IM	Posición III	411	878	748	< 20
2g2 no doc 10 ug IM	Posición II	> 320	> 2560	> 2560	> 2560
2g2 no doc 10 ug IM	Posición III	> 2560	> 2560	> 2560	1407
2g2 no doc 1 ug IM	Posición II	> 2560	> 2560	> 2560	119
2g2 no doc 1 ug IM	Posición III	> 2560	> 2560	> 2560	348
2gecoN 1b-1no doc 10 ug IM	Posición II	> 2560	> 2560	> 2560	1162
2gecoN 1b-1no doc 10 ug IM	Posición III	> 2560	> 2560	> 2560	1213
2gecoN 1b-1no doc 1 ug IM	Posición II	1151	> 2560	1896	22
2gecoN 1b-1no doc 1 ug IM	Posición III	2220	> 2560	1947	135
c6 doc 10 ug IM	Posición II	308	248	341	< 20
c6 doc 10 ug IM	Posición III	189	104	400	< 20
c6 doc 1 ug IM	Posición II	33	43	63	< 20
c6 doc 1 ug IM	Posición III	NC (> 20)	24	156	< 20
2g2 doc 10 ug IM	Posición II	NC (> 20)	25	380	< 20
2g2 doc 10 ug IM	Posición III	201	< 20	647	< 20
2g2 doc 1 ug IM	Posición II	275	< 20	299/644	< 20
2g2 doc 1 ug IM	Posición III	237	< 20	728	< 20
2gecoN 1b-1doc 10 ug IM	Posición II	573	31	685	< 20
2gecoN 1b-1doc 10 ug IM	Posición III	NC (> 40)	21	1140	< 20
2gecoN 1b-1doc 1 ug IM	Posición II	261	NC	118	< 20
2gecoN 1b-1doc 1 ug IM	Posición III	348	NC	692	< 20

Claramente la presencia de L3 (2g2) o epítipo intermedio (2 gecon 1b-1) induce anticuerpos bactericidas cruzados, mientras las ampollas de la cepa LPS truncada (C6) induce un nivel inferior de anticuerpos de reacción cruzados. Esto se ilustra particularmente cuando se inyectó 1 μ de OMV.

Además, como se muestra con OMV purificadas con DOC, reduciendo el contenido de LPS de las burbujas se reduce la inducción de anticuerpos bactericidas cruzados. Aparte de LPS aumentado, es posible que ampollas

exentas de DOC puedan retener ventajosamente algunas proteínas que interactúan perdidamente con los OMV tales como lipoproteínas.

Ejemplo 4: reticulación intra ampollas de LOS L3 y proteína de membrana externa

Las ampollas de MenB utilizadas se derivan de un a cepa H44/76 (LOS de inmunitipo de L3) que era SiaD⁻ (de este modo no expresando polisacárido capsular) y PorA⁻. Se utilizaron dos cepas diferentes: un completo L3 (cepa B1717, siad (-) Por A (-) completo L3) y un truncado L3 (cepa B1727, siad (-) PorA(-) lgtB(-) TrL3).

El procedimiento de conjugación de EDAC/NHS se utilizó según procedimientos conocidos para reticular LOS y OMP en las ampollas para obtener el componente de oligosacárido de LOS un antígeno T dependiente (EDAC/NHS se prefiere a formaldehído que se encontró reticular demasiado alto una extensión que afectaba de este modo adversamente la filtrabilidad). EDAC reacciona con ácidos carboxílicos para crear un intermedio de éster activo. En presencia de un nucleófilo de amina, se forma un enlace de amida con liberación de un subproducto de isourea. Sin embargo, la eficacia de una reacción mediada por EDAC se puede incrementar mediante la formación de un intermedio de éster Sulfo-NHS. El éster sulfo-NHS sobrevive en solución acuosa más tiempo que el éster formado de la reacción de EDAC solo con un carboxilato. De este modo se pueden llevar a cabo rendimientos más altos de la formación de enlace de amida usando este procedimiento en dos etapas. La conjugación de EDAC/NHS se describe en J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220 – 222 (1986); y Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp 173 – 176.

La mezcla de reacción contenía 1,5 mg de Sulfo-NHS y 5 mg de EDAC en

sacarosa al 3% (para estabilidad de ampolla) en un volumen final de 1 ml. Las ampollas estaban presentes en una relación de 0,025 mg EDAC/mg de ampollas. Las ampollas estaban presentes en una concentración de 2 mg/ml y el pH se ajustó hasta 7,5 con HCl 0,1 N.

La reacción se dejó durante 4 horas a temperatura ambiente y se dializó la mezcla contra tampón fosfato 2 mM que contenía sacarosa al 3%, pH 7,5. Después la mezcla se filtró sobre Sterivex G10 0,22 µm. Se recuperó una producción de 99% de ampollas.

La reacción podría seguirse en una transferencia de Western usando anti.L3 mAb. Mediante la reacción del bajo LOS MW se llega a hacer más débil y una nueva banda de MW más alta aparece en el gel. Esta banda de MW más alta parece predominar y puede representar la mayoría de LOS conjugados que llega a estar covalentemente unido a PorB.

Se encontró que EDAC es un agente excelente de reticulación intra-ampollas en que reticulaba LOS a OMP irreversiblemente y suficientemente para inmunogenicidad T dependiente de LOS mejorado, pero no se reticulaba a tan alto grado que sucedían problemas tales como escasa filtrabilidad, agregación y reticulación intra-ampollas. La morfología de las ampollas generadas es similar a la de las ampollas no conjugadas (como se observó mediante micrografía electrónica). Además el protocolo anterior evitaba que tuviese lugar una demasiada reticulación (que puede disminuir la inmunogenicidad de OMP protectoras presentes naturalmente en la superficie de la ampolla por ejemplo TbpA.

Ejemplo 5: L3 y L3 truncado (intermedio lgtB-) pueden inducir la producción de ABs bactericida que reconoce LOS L3 truncado (intermedio lgtB; TrL3)

OMV (ampollas) se produjeron de la cepa de MenB H44/76 siaD- PorA- L3 o de H44/76 siaD- porA TrL3. Se realizaron dos extracciones diferentes; el

porcentaje de DOC usado era bien 0,1% ó 0,5%. También se evaluaron dos formulaciones diferentes de adyuvante: $\text{Al}(\text{OH})_3$ o fosfato de aluminio + 3D-MPL. Ratones (hembras de ratones OF1, 6 – 8 semanas de edad, 30 por grupo) se inyectaron 3 veces (en los días 0, 21 y 28) por vía IM (5 μg de ampollas / inyección). SBA se recogió en la posición II (día 28) y la posición III (día 42) los sueros (sueros combinados o sueros individuales).

El título de media geométrica y el título de sueros combinados para 50% de muerte celular era mayor para los sueros inducidos mediante ampollas extraídas con 0,1% de DOC comparado con la extracción de 0,5% de DOC. Esto se explica probablemente por el hecho que allí tiende a ser 2,5 veces como mucho de LOS en las ampollas anteriores comparada con la última. No había diferencia significativa entre SBA de suero inducido con las ampollas que contienen LOS L3 completo o LOS L3 truncado. Hay un incremento en SBA si las ampollas se adyuvan con fosfato de aluminio + 3D-MPL comparado con hidróxido de aluminio.

También se hicieron experimentos de agotamiento de sueros. Los sueros se agotaron usando 1 mg/ml de L3 o LOS trL3 purificados y después se realizaron SBA sobre estos sueros agotados. Los resultados mostraban que Abs bactericida (que contenía anticuerpos anti-L3) su puede agotar casi completamente mediante pretratamiento de LOS trL3 de sueros, y Abs bactericida (que contenía anticuerpos anti-trL3) se puede casi agotar completamente mediante pretratamiento con LOS L3 de sueros. Abs bactericida anti-L3 son de este modo capaces de reaccionar con LOS trL3 y Abs bactericida anti-trL3 son de este modo capaces de reaccionar con LOS L3. Además, de este modo se han demostrado la especificidad de Abs bactericida para una estructura de LOS presente en ambos L3 y LOS trL3.

En conclusión, los autores han demostrado que la estructura de TrL3 (en las OMV) es capaz de inducir la producción de Abs bactericida contra cepas L3. En combinación con los experimentos de agotamiento, los autores han mostrado

que TrL3 y LOS L3 son estructuras muy próximas en una base inmunológica, y trL3 se puede utilizar para generar Ab capaz de matar cepas L3.

Ejemplo 6: TrL3 soluciona el problema potencial de autoinmunidad con la estructura de L3 completa

¿Si las estructuras L3 y trL3 están tan próximamente relacionadas inmunológicamente en términos de anticuerpos protectores, hay alguna diferencia entre las estructuras con respecto a las posibles cuestiones de autoinmunidad asociadas con LOS L3 (y L2) [mediante el resto de lacto-N-neotetraosa]? ¿Los autores han dirigido esta cuestión mirando si las aglutininas frías son capaces de reconocer LOS trL3?

MAb 1B2-1B7 (J Bio Chem 256(1981) 10967 – 10972; y depósito de ATCC número TIB – 189) se conoce que aglutinan los glóbulos rojos de adultos de seres humanos (abreviadamente RBC) a bajas temperaturas y reaccionan con LNnT (lacto-N-neotetraosa). Esto es una aglutinina fría típica.

Se utilizó el anticuerpo monoclonal en el siguiente experimento en conjunción con un anticuerpo monoclonal MabL3,7,9 que es capaz de matar cepas meningocócicas L3.

Estos dos mAbs se utilizaron en ELISA con microplacas prrrecubiertas con poli-L-lisina (1 µg/ml, 2 h a 37°C) y después de recubrieron con L3 purificado o LOS TrL3 purificado (5 µg, durante una noche a 4°C). Después las placas se saturaron con BSA (1%, 30 minutos a temperatura ambiente). Después se llevó a cabo un ELISA convencional con cada uno de los dos anticuerpos.

Los resultados (figura 4) muestran claramente que Mab L379 reacciona con L3 y TrL3 (figura 4B) pero 1B2-1B7 reacciona solamente contra LOS L3 (figura 4A). De este modo los autores pueden decir que TrL3 no se reconoce por aglutinina fría que reacciona contra estructuras que contienen tetrasacárido LNnT (tal como LOS L3 y glóbulos rojos de seres humanos).

De este modo LOS TrL3 tiene las características óptimas de ser mucho tiempo suficiente capaz para retener epítomos protectores, pero brevemente suficientes para perder epítomos que pudieran tener implicaciones autoinmunes en seres humanos.

No existe razón para sugerir que esto no debe también ser el caso para la estructura de LOS L2 (IgtB-) truncada propuesta en esta solicitud de patente.

Ejemplo 7: Impacto de reticulación en la pirogenicidad/antigenicidad de ampollas B1820 0,1% de DOC

Ampollas (de la cepa B1820; que se derivaban de H44/76 con siaD(-) PorA(-) FrpB(-)Hsf truncado regulado hacia niveles mayores, L3 truncado mediante la cepa de mutación lbtB(-), cultivadas en presencia de desferral, se extrajeron las ampollas con 0,1% de DOC se reticularon utilizando diferentes concentraciones de EDAC (cuanto más de EDAC está presente, más se reticulan la ampollas). La reticulación es intra-ampolla como se muestra mediante filtración estéril de las ampollas.

El contenido en LOS en las ampollas es 18% como se mide mediante tinción con plata después de electroforesis de SDS-PAGE utilizando LOS L3 Nmen purificado como patrón (Tsai, J. Biol. Standardization (1986) 14: 25 – 33). En general el contenido de LOS en las ampollas extraídas con 0,1% de DOC es alrededor de 20% de LOS, con 0,2% de DOC es alrededor de 15% de LOS, con 0,3% de DOC es alrededor de 10% de LOS y con 0,5% de DOC es alrededor de 5% de LOS. En general las ampollas que comprenden 10% de LOS sin conjugar o más son inaceptablemente pirógenas.

Pirogenicidad en conejos

Se ensayaron dos formulaciones (ampollas absorbidas en Al(OH)₃ o AlPO₄) y los conejos recibieron 500 ng/kg por vía IV en un ensayo de pirogenicidad como

se describe en la Farmacopea Europea.

Los resultados muestran claramente (en la tabla más adelante) un impacto positivo de la reticulación intra-ampolla en la pirogenicidad de las ampollas. El mismo lote de ampollas se utilizó como control o se reticularon con diferentes concentraciones de EDAC. Cuanto más se reticulaban las ampollas (más EDAC) eran menos pirógenas. Esto se observó para dos diferentes formulaciones.

Tratamiento	Formulación		
	Al(OH) ₃	AlPO ₄	Ambas formulaciones [§]
No reticuladas	3,1*	2,8	5,9
EDAC 0,05 [‡]	2,7	2,2	4,9
EDSC 0,2	1,7	1,7	3,4
EDAC 1	1,5	1,4	2,9

[‡] concentración de EDAC: mg de EDAC por mg de ampollas
* suma de incremento de temperatura (°C) individual (3 conejos por grupo)
[§] suma de seis conejos (3 del grupo de Al(OH)₃ y 3 para el grupo de AlPO₄)

Antigenicidad de ampollas reticuladas

La antigenicidad de las ampollas anteriores (no adsorbidas) se valoró para determinar si la reticulación tenía algún impacto en la antigenicidad de las ampollas. Las diferentes preparaciones de ampollas (reticuladas o no) se recubrieron en una microplaca (10 µg/ml, durante una noche a 4°C). Después de lavado y saturación, se añadieron a la placa dilución en serie de MAb L379 o sueros de ratones inmunizados con B1820 DOC al 0,1 ó al 0,5% (30 minutos a temperatura ambiente con agitación). La fijación de anticuerpos en ampollas recubiertas se revelaba usando anti-ratón Ig acoplado a biotina después usando un complejo de estreptavidina-peroxidasa seguido de un revelado usando OPD y H₂O₂. La densidad de cada micropocillo se media usando un lector de microplacas.

Los resultados muestran que MAb L739 (dirigida contra LOS L3 pero

también capaz de reaccionar con LOS TrL3 (el mutante lgtB⁻) y bactericida contra cepas L3) reconoce equivalentemente ampollas B1820 (sin conjugar) no tratadas y las diferentes ampollas reticuladas (sea la que sea la concentración de EDAC utilizada). Véase la figura 5A. La respuesta más alta obtenida con 0,2 y 1 de EDAC podría reflejar un mejor anclaje de LOS en las ampollas o al menos una mejor estabilidad de LOS en ampollas reticuladas a estas concentraciones de EDAC.

También se utilizó suero de ratones para valorar la antigenicidad de estas ampollas. Se utilizaron dos diferentes tipos de sueros; el primero se obtuvo de ratones inmunizados con ampollas B1820 0,5% de DOC (ampollas con bajo contenido en LOS $\leq 8\%$ induciendo principalmente anticuerpos antiproteína). El segundo suero se obtuvo de ratones inmunizados con ampollas B1820 0,1% de DOC (ampollas con contenido en LOS $\geq 15\%$ induciendo Abs bactericida cruzado dirigido principalmente contra LOS) Como se observa con MAb, L379 los resultados obtenidos con estos dos sueros (figura 5 B y 5C respectivamente) no mostraban ninguna diferencia entre ampollas no tratadas (sin conjugar) y ampollas reticuladas (sea la que sea la concentración de EDAC utilizada).

En conclusión, parece que la antigenicidad de LOS no se afectaba por la reticulación y que la antigenicidad "global" de las ampollas tampoco se modificaba por el tratamiento de EDAC. Los experimentos de inmunogenicidad en ratones están en curso para confirmar que la reticulación (con altas concentraciones de EDAC) no destruye la inmunogenicidad de antígenos protectores clave. Sin embargo, los resultados preliminares (ejemplo 8) muestran donde la reticulación se hizo con 0,05 de EDAC en ampollas extraídas con 0,5% de DOC indicaban un incremento en la inmunogenicidad de estas ampollas después de tratamiento con EDAC.

Ejemplo 8: Inmunogenicidad de ampollas reticuladas (química con 0,05 mg de EDAC)

En este experimento se produjeron ampollas de la cepa B1727. Esta cepa es una cepa modificada genéticamente de H44/76, que es siaD(-) PorA(-) trL3 (lgtB⁺) Hsf+TbpA regulada hacia niveles mayores) Se extrajeron las ampollas utilizando 0,5% de DOC. Se inmunizaron los ratones tres veces (los días 0, 21 y 28) por vía IM. Por inyección, recibían 5 µg de ampollas adsorbidas en Al(OH)₃.

Se realizó un ensayo bactericida de suero contra la cepa H44/76 en sueros individuales tomados 14 días después de la tercera inyección. Los resultados muestran un impacto positivo de tratamiento de EDAC sobre el número de respondedores (número de ratones con título de SBA > 100): 37% de respondedores para ampollas tratadas con EDAC y solamente 17% con ampollas no modificadas.

La ausencia de 3D-MPL en formulación y el relativamente bajo porcentaje de LOS en las preparaciones de ampollas (alrededor de 5%) después de extracción con 0,5% de DOC explican la bajas respuestas.

Ratones	B1727 SiaD (-) PorA (-) TrL3 TbpA – Hsf Reticulación con "EDAC" Procedimiento "UF/GPC/UF"	Ampollas B1727 SiaD (-) PorA (-) TrL3TbpA – Hsf Sin tratamiento Procedimiento "UF/GPC/UF"
GMT	52	27
SBA en combinaciones	249	80
Respondedores	11/30	5/30

También se realizó un ELISA de anti-Hsf para determinar si la reticulación tiene un impacto en la inmunogenicidad de esta proteína. Los resultados (obtenidos en sueros combinados) indican que la reticulación no tiene impacto en la respuesta de Ig anti-Hsf. No se detectó IgM.

	ELISA de anti-Hsf	
	IgM	IgG
B1727 SiaD (-) PorA (-) TbpA- HsfTrL3 Reticulación con "EDAC"	50	18140
B1727 Siad (-) PorA (-) TbpA-Hsf TrL3	50	15627
Control negativo	50	50

Ejemplo 9: Datos de LOS TrL3

El siguiente experimento valoraba:

- el impacto de LOS L3 (lgtB(-)TrL3) en la inducción de Abs capaz de reaccionar con LNnT (lacto-N-neotetraosa);
- la inducción de anticuerpos bactericidas de la construcción anterior.

Se produjeron las ampollas a partir de dos cepas genéticamente modificadas de H44/76. Ambas eran siaD(-) PorA(-) pero una producía un WT L3 LOS y la segunda un LOS TrL3 (lgtB(-)). Estas ampollas se produjeron según dos procedimientos diferentes con el fin de tener alto contenido en LOS (alrededor de 18%, usando extracción con 0,1% de DOC) o bajo contenido en LOS próximo al 5%, usando extracción con 0,5% de DOC).

Los ratones se inmunizaron tres veces (los días 0, 21 y 28) por vía IM con 5 µg de ampollas (por inyección) adsorbidas en Al(OH)₃ con o sin 3D-MPL.

ELISA de anti-LNnT

Procedimiento: se recubrieron microplacas con LNnT conjugado a albúmina sérica de tipo humano mediante un espaciador (ADH) (5 µg de conjugados por ml en PBS, 100 µg por micropocillo). Después de una incubación durante una noche a 4°C, se lavaron las placas y se saturaron con 1% de PBS-BSA (40 minutos a temperatura ambiente). Después de lavado, se diluyeron en serie en 0,2% de

PBS - 0,5% de BSA.

Se añadió Tween 20 (30 minutos a temperatura ambiente). La fijación de IgG a LNnT se reveló mediante anti-ratón-IgG acoplado a peroxidasa(Jackson) seguido de incubación con OPDA y H₂O₂.

Resultados: El control positivo es 1B2-1B7 MAb. Este MAb reacciona con LNnT y con LOS L3 (pero no LOS TrL3) (véase ejemplo anterior) y aglutina los glóbulos rojos de seres humanos. El control negativo (-) es forma de sueros de ratones inmunizados con adyuvante solo.

Los resultados (figura 6) muestran claramente que solamente las ampollas de L3 con alto contenido en LOS (0,1% de DOC) inducen la producción de IgG capaz de reaccionar con LNnT. Las ampollas de Tr L3 con un contenido similar de LOS no inducen la producción de IgG dirigida contra LNnT, como no ambas preparaciones de ampollas que contienen menor cantidad de LOS (0,5% de DOC).

SBA en la cepa H44/76

Se realizaron ensayos de SBA contra la cepa H44/76 en sueros individuales tomados 14 día después de la tercera inyección. Los resultados muestran claramente más adelante que ampollas LOS trL3 (IgtB(-))inducen niveles similares de anticuerpos bactericidas que LOS L3 (véase GMT pero también el número de ratones con el título de SBA > 1/100 (=SC)).

Formulación		Ampollas L3		Ampollas TrL3	
		0,5% de DOC	0,1% de DOC	0,5% de DOC	0,1% de DOC
Al(OH) ₃ + MPL	GMT	331	4125	1029	3204
	SC	19/30	29/30	27/30	30/30
Al(OH) ₃	GMT	169	2029	138	828
	SC	14/30	29/30	13/30	30/30

Ejemplo 10: Eliminación de FrpB

Los siguientes datos son un sumario de dos experimentos preclínicos.

En estos experimentos dos cepas genéticamente modificadas de H44/76 se utilizaron para producir ampollas usando 0,1% de DOC. Las ampollas obtenidas mediante este procedimiento tienen un contenido en LOS próximo a 20%.

Las dos cepas de H44/76 eran las siguientes:

- B1733: siaD(-) Por A(-) Tr (truncada) Hsf regulada en ascenso lgtB(-)
- B1820: siaD(-) Por A(-) TrHs regulada hacia niveles mayores lgtB(-) FrpB(-)

Las ampollas se produjeron después de que las cepas se desarrollaran en presencia de desferral para regular hacia niveles mayores la producción de proteínas dependientes de hierro tales como LbpA/B, TbpA/B, FrpB (en B1733), etc.

Las diferentes preparaciones de ampollas se adsorbieron en $\text{Al}(\text{OH})_3$ y se inyectaron en ratones por vía IM dos veces, con una separación de tres semanas. Se tomaron muestras de sangre 7 días después de la segunda administración. Los ratones recibían por inyección 5 μg de ampollas.

Resultados de SBA

Se realizaron ensayos bactericidas en tres cepas de L3 (la cepa de tipo salvaje homóloga H44/76 y dos cepas heterólogas de L3: NZ124 y M97250687. Los resultados muestran claramente que las ampollas (B1820) FrpB(-) (eliminación) inducen una mejor respuesta bactericida cruzada heteróloga (títulos altos y mejor seroconversión (abreviadamente SC)) que las ampollas (B1733) FrpB(+). La respuesta homóloga, aunque se reducía mediante la supresión de FrpB, es todavía satisfactoria.

Estos datos sugieren que FrpB es un mayor conductor en la respuesta

inmune provocada por ampollas, pero, como esta proteína de membrana externa es altamente variable, los anticuerpos dirigidos contra esta proteína son solamente capaces de inducir la muerte de la cepa homóloga. La supresión de FrpB en la cepa de producción de ampollas es por lo tanto un medio ventajoso de mejorar la cobertura de la vacuna de ampollas producida.

Ampollas	H44/76		M97250687		NZ124	
	GMT	SC	GMT	SC	GMT	SC
B1733	1518	30/30	151	11/30	70	4/29
B1820	781	19/30	1316	24/30	276	19/30

Ejemplo 11: Impacto de la mutación de msbB (lpxL1) sobre la pirogenicidad de ampollas

Dos cepas de NmenB se utilizaron para esta evaluación:

- la cepa de control que es galE(-) [y de este modo incapaz de fabricar polisacárido capsular]
- la cepa mutante *msbB*: que es galE(-) y msbB(-)

Las ampollas se produjeron a partir de estas dos cepas usando 0,1% de DOC con el fin de tener más de 15% de contenido en LOS en las OMV (ampollas). Como se ha establecido en los ejemplos previos, las preparaciones de ampollas con un contenido en LOS mayor que 10% no son satisfactorias desde un punto de vista de pirogenicidad y fracasa el ensayo de pirogenicidad en conejos de la Farmacopea Europea.

Las ampollas anteriores se formularon en Al(OH)₃ (50 µg de OMV/500 µg de sales de Al₃) para un ensayo de pirogenicidad en ratones (500 ng de ampollas/kg inyectados por vía IV).

Los resultados más adelante demuestran claramente que la supresión de *msbB* (particularmente en una cepa incapaz de fabricar polisacárido capsular) permite la producción de ampollas que son no pirógenas en conejos incluso para un contenido en LOS mayor que 15%.

Ampollas	Dilución	Incremento de t° individual (°C)	Suma de t°	Conclusión
Control 0,1% de DOC	0,5 µg/kg	0,7 – 1,4 – 1,2	3,3	Fracaso
msbB(-) 0,1% de DOC	0,5 µg/kg	0,1 – 0,2 – 0,2	0,5	Pasa

Reglas de la Farmacopea Europea:

- "Pasa" si la suma de t° individuales < 1,15°C
- "Fracasa si no repite" si la suma de t° individuales está entre 1,15°C y 2,65°C
- "Fracasa" si la suma de t° individuales > 2,65 °C

Conclusión:

Una composición que comprende ampollas L3 y L2 derivadas de cepas meningocócicas que tienen las mutaciones *lgtB*(-) y *msbB*(-) y se extraen con bajas concentraciones de deoxicolato (por ejemplo 0,1%) proporciona una base fuerte para una vacuna eficaz, segura contra meningococo B. Las cepas de producción de ampollas son idealmente deficientes en síntesis de polisacárido capsular y tienen LOS que están reticulados intra-ampolla a la proteína de membrana externa. Cualquier o ambas de *PorA*(-) y *FrpB*(-) son de ayuda adicional en la mejora de la eficacia bactericida cruzada, como son regulaciones hacia niveles mayores de antígenos *Hsf* y/o *TbpA*.

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y de derecho exclusivo:

1. Una preparación de ampollas de *Neisseria* derivada de una cepa de *Neisseria* con un inmutotipo LOS L2 o de una cepa de *neisseria* con un inmutotipo L3 LOS y en la que la cepa es IgtB^- ; o una preparación en ampolla de *Neisseria* que comprende una combinación de ampollas derivadas de una cepa *neisseria* con un inmutotipo L2 LOS y una cepa *neisseria* con un inmutotipo L3 LOS, en la que opcionalmente cada cepa es IgtB^- .

2. La preparación de ampollas de *Neisseria* de la reivindicación 1, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* son meningocóccas, preferiblemente serogrupo B.

3. La preparación de ampollas de *Neisseria* de la reivindicación 1 ó 2, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* no pueden sintetizar polisacárido capsular.

4. La preparación de ampollas de *Neisseria* de la reivindicación 3, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* tienen uno de los siguientes genes de polisacárido capsular regulados hacia niveles menores de expresión, y preferiblemente suprimidos, comparados con la (s) cepa (s) nativa (s) a partir de las que se derivan: *ctrA*, *ctrB*, *ctrC*, *ctrD*, *synA*, *synB*, *synC* o, preferiblemente, *siaD*; y en la que cuando las ampollas L2 y L3 están ambas presentes, las cepas de las que se derivan tienen preferiblemente el mismo gen de polisacárido capsular regulado hacia niveles menores de expresión en cada cepa.

5. La preparación de ampollas de *Neisseria* de las reivindicaciones 1 - 4, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* tienen cualquier o ambos de los siguientes genes de lípido A regulado hacia niveles menores de expresión, y preferiblemente suprimidos, comparados con la (s) cepa (s) nativa (s) a partir de las que se derivan: *msbB* o *htrB*, preferiblemente el primero; y en la que cuando

las ampollas L2 y L3 están ambas presentes, las cepas de las que se derivan tienen preferiblemente el (los) mismo (s) gen (es) de lipido A regulado hacia niveles menores de expresión en cada cepa.

6. La preparación de ampollas de *Neisseria* de las reivindicaciones 1 - 5, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* tienen 1 o más de los siguientes genes de proteína de membrana externa regulado hacia niveles menores de expresión, y preferiblemente suprimidos, comparados con la (s) cepa (s) nativa (s) a partir de las que se derivan: porA, porB, opA, opC, pilC o frpB; y en la que cuando las ampollas L2 y L3 están ambas presentes, las cepas de las que se derivan tienen preferiblemente el (los) mismo (s) gen (es) de proteína de membrana externa regulados hacia niveles menores de expresión en cada cepa.

7. La preparación de ampollas de *Neisseria* de la reivindicación 6, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* tienen cualquiera de las siguientes combinaciones de genes de proteína de membrana externa regulado hacia niveles menores de expresión, y preferiblemente suprimidos, comparados con la (s) cepa (s) nativa (s) a partir de las que se derivan: PorA y OpA, PorA y OpC, OpA y OpC, PorA y OpA y OpC, PorA y FrpB, OpC y FrpB, OpA y FrpB, PorA y OpA y OpC y FrpB.

8. La preparación de ampollas de *Neisseria* de las reivindicaciones 1 - 7, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* tienen 1 o más de los siguientes antígenos de proteína de membrana externa regulados hacia niveles mayores de expresión: NspA, TbpA bajo, TbpA alto, Hsf, Hap, OMP85, PilQ, NadA, LbpA, MltA; y en la que donde las ampollas L2 y L3 están ambas presentes, las cepas de las que se derivan tienen preferiblemente uno o más antígenos diferentes de proteína de membrana externa regulados hacia niveles mayores de expresión en cada cepa.

9. Una preparación de ampollas de *Neisseria* derivada de una cepa de *Neisseria* que ha tenido dos o más de las proteínas de membrana externa reguladas hacia niveles menores de expresión, y preferiblemente suprimidas,

comparadas con la cepa nativa de la que se deriva: PorA, PorB, OpA, OpC, PilC o FrpB.

10. La preparación de ampollas de *Neisseria* de la reivindicación 9, en la que la cepa de *Neisseria* ha tenido cualquiera de las siguientes combinaciones de proteínas de membrana externa reguladas: hacia niveles menores de expresión, y preferiblemente suprimidas, comparadas con la cepa nativa a partir de las que se deriva: PorA y OpA, PorA y OpC, OpA y OpC, PorA y OpA y OpC, PorA y FrpB, OpC y FrpB, OpA y FrpB, PorA y OpA y OpC y FrpB.

11. La (s) cepa (s) de *Neisseria* a partir de las que las preparaciones de ampollas de *Neisseria* de las reivindicaciones 1 – 10 se derivan.

12. Una preparación de LOS aislada de la (s) cepa (s) de *Neisseria* de la reivindicación 11 que comprende inmunotipo LOS L2 y/o L3.

13. La preparación de LOS de la reivindicación 12 en una formulación de liposomas.

14. La preparación de las ampollas de *Neisseria* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 10 o la preparación de LOS de la reivindicación 12 ó 13, en la que los LOS contenidos en ella se conjugan a una fuente de epítopos auxiliares T, preferiblemente una proteína o proteína de la membrana externa.

15. La preparación de las ampollas de *Neisseria* de la reivindicación 14 que se puede obtener mediante un procedimiento de reticulación intra-ampollas.

16. Una composición o vacuna inmunogénica que comprende la preparación de ampollas de *Neisseria* la preparación de LOS de una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 10 ó 12 – 15 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

17. La vacuna de la reivindicación 16, que comprende adicionalmente un adyuvante, preferiblemente hidróxido de aluminio, o 3D-MPL y fosfato de aluminio.

18. La vacuna de la reivindicación 16 ó 17 que comprende

adicionalmente uno o más polisacáridos capsulares conjugados u oligosacáridos derivados de las siguientes cepas: meningococo serogrupo A, meningococo serogrupo C, meningococo serogrupo W-135, meningococo serogrupo Y, y *H. influenzae* tipo b.

19. Un procedimiento de fabricación de vacuna de preparación de ampollas de *Neisseria* de la reivindicación 16 que comprende las etapas de cultivar la (s) cepa (s) de *Neisseria* de la reivindicación 11, aislar las ampollas de aquellas, opcionalmente combinar las ampollas L2 y L3 si es adecuado, y formular las ampollas con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la etapa de aislamiento se lleva a cabo mediante extracción con 0 – 0,5, 0,02 – 0,4, 0,04 – 0,3, 0,06 – 0,2 ó 0,08 – 0,15% de desoxicolato, preferiblemente con aproximadamente o exactamente 0,1% de desoxicolato.

21. Una preparación de ampollas de una cepa de bacterias Gram – negativas en la membrana externa de la que se integra una proteína de membrana externa conjugada a LOS.

22. La preparación de ampollas de la reivindicación 21, en la que más de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, ó 99% de LOS conjugados tienen su resto de lípido A integrado en la membrana externa de la ampolla y/o en un ambiente en el que su toxicidad se reduce o se protege de un hospedador al cual se ha administrado.

23. La preparación de ampollas de la reivindicación 21 ó 22, en la que la toxicidad de LOS en la ampolla se reduce comparada con las ampollas con la misma cantidad de LOS no conjugada.

24. La preparación de ampollas de la reivindicación 21 - 23, en la que más de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, ó 99% de LOS conjugado está en una conformación nativa adecuada para inducir una respuesta de anticuerpo bactericida contra él cuando se administra a un sistema inmune de hospedador.

25. La preparación de ampollas de las reivindicaciones 21 – 24, en la que los LOS tienen una conformación adecuada para provocar una respuesta inmune en un reactivo de hospedador contra LOS no conjugados.

26. La preparación de ampollas de las reivindicaciones 21 – 25, en la que la proteína de membrana externa se conjuga al resto de oligosacáridos o polisacáridos de la molécula de LOS.

27. La preparación de ampollas de las reivindicaciones 21 – 26, en la que la proteína de membrana externa y la molécula de LOS son nativas a la cepa de bacterias Gram – negativas de las que las ampollas se derivan.

28. La preparación de ampollas de las reivindicaciones 21 – 27 obtenible mediante un procedimiento de reticulación intra-ampolla.

29. La preparación de ampollas de las reivindicaciones 21 - 28, en la que más de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90. ó 99% de LOS presente en las ampollas está reticulado.

30. La preparación de ampollas de las reivindicaciones 21-29 derivada de una cepa Gram-negativa que no produce polisacárido capsular, o de una preparación de ampollas que no comprende polisacárido capsular.

31. La preparación de ampollas de las reivindicaciones 21 - 30, en la que el polisacárido capsular no se conjuga a una proteína de membrana externa integrada en la preparación de ampollas.

32. La preparación de ampollas de las reivindicaciones 21 – 31 derivada de una cepa de *Moxarella catarrhalis* o de *Haemophilus influenzae* no caracterizable.

33. La preparación de ampollas de las reivindicaciones 21 – 31 derivada de una cepa de *Neisseria* preferiblemente *Neisseria meningitidis*.

34. La preparación de ampollas de la reivindicación 33, en la que la preparación de ampollas comprende LOS L2 conjugados, LOS L3 conjugados o una mezcla de de LOS L2 y L3 conjugados, preferiblemente conjugados separadamente a al menos 2 ampollas diferentes.

35. La preparación de ampollas de la reivindicación 33 ó 34 derivada de cepas lgtB⁻, o en la que el LOS tiene una estructura truncada consistente con la que se ha derivado de una cepa que es lgtB⁻.

36. La preparación de ampollas de las reivindicaciones 32 - 35 derivada de cepas htrB⁻ y/o msbB⁻, o en la que el resto de lípido de LOS carece de cadenas de acilo secundarias consistente con la que se ha aislado de una cepa meningocócica htrB⁻ y/o msbB⁻.

37. Una composición o vacuna inmunogénica que comprende la preparación de ampollas de las reivindicaciones 21 - 36 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

38. La composición o vacuna inmunogénica de la reivindicación 37 que comprende adicionalmente un adyuvante, preferiblemente hidróxido de aluminio, o 3D-MPL y fosfato de aluminio.

39. La composición o vacuna inmunogénica de la reivindicación 37 ó 38 que comprende adicionalmente uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares conjugados derivados de las cepas siguientes: meningococo serogrupo A, meningococo serogrupo C, meningococo serogrupo W-135, meningococo serogrupo Y, y *H. influenzae* tipo b.

40. Un procedimiento de producir una preparación de ampollas conjugadas intra-ampolla de una cepa de bacterias Gram - negativas en la membrana externa de la que se integra una proteína de membrana externa conjugada a LOS, que comprende las etapas de:

- a) aislar ampollas de la cepa Gram - negativa,
- b) llevar a cabo la química adecuada para conjugar el resto de oligosacáridos de LOS presente en las ampollas a una proteína de membrana externa presente en la misma ampolla,
- c) aislar la preparación de ampollas conjugadas intra-ampolla, y
- d) formular opcionalmente la preparación de ampollas conjugadas intra-

ampolla con una preparación adicional de ampollas conjugadas intra-ampolla fabricada mediante el mismo procedimiento pero teniendo un inmunotipo LOS diferente y/o formular al preparación de ampollas con un excipiente farmacéuticamente aceptable para fabricar una composición de vacunas.

41. El procedimiento de la reivindicación 40 en el que en la etapa a) las ampollas se extraen usando una concentración baja de desoxicolato tal como 0 – 0,3%, preferiblemente alrededor de o exactamente 0,1%.

42. El procedimiento de la reivindicación 40 ó 41, en el que en la etapa b) el pH se mantiene entre 7 y 9, preferiblemente alrededor de 7,5.

43. El procedimiento de las reivindicaciones 40 - 42, en el que la etapa b) se lleva a cabo en 1 – 5% de sacarosa, preferiblemente alrededor de 3%.

44. El procedimiento de las reivindicaciones 40 - 43, en el que la etapa b) se lleva a cabo en condiciones de baja concentración de NaCl.

45. El procedimiento de las reivindicaciones 40 - 44, en el que la etapa b) se lleva a cabo con química de EDAC/NHS.

46. El procedimiento de las reivindicaciones 40 - 45, en el que en la etapa a) las ampollas se aíslan de una cepa de *Neisseria*, preferiblemente una cepa meningocócica, más preferiblemente una cepa de meningococo B.

47. El procedimiento de la reivindicación 46 en el que la cepa no puede fabricar polisacárido capsular y es preferiblemente un mutante *siaD*⁻.

48. El procedimiento de la reivindicación 46 ó 47 en el que la cepa es un mutante *lgtB*⁻.

49. El procedimiento de las reivindicaciones 46 - 48 en el que la cepa es un *msbB*⁻ y/o *htrB*⁻.

50. El procedimiento de las reivindicaciones 46 - 49 en el que la cepa tiene un inmunotipo LOS L2.

51. El procedimiento de las reivindicaciones 46 - 50 en el que la cepa

tiene un inmunotipo LOS L3.

52. El procedimiento de las reivindicaciones 46 - 51 en el que en la etapa d) una preparación de ampollas conjugadas intra-ampolla meningocócica con un inmunotipo L2 fabricado mediante el procedimiento de la reivindicación 50 se combina con una preparación adicional de ampollas conjugada intra-ampolla meningocócica con un inmunotipo L3 fabricado mediante el procedimiento de la reivindicación 51.

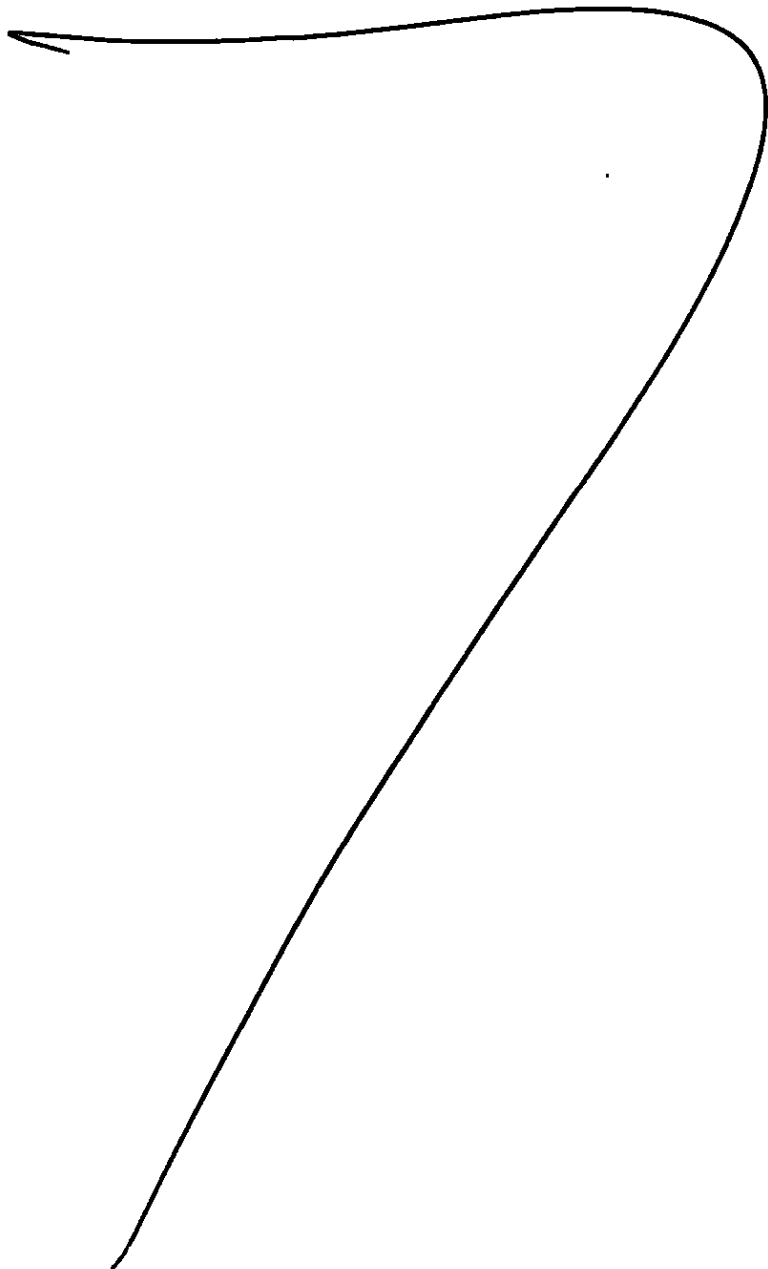


Figura1: Inmunotipos L3 y L2 (Cepas H44/76,MC58)

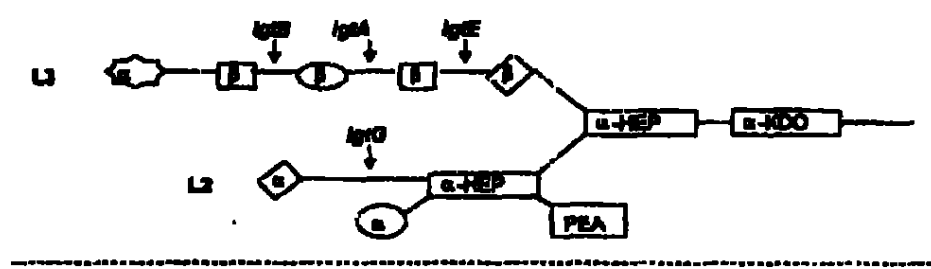


Figura 3A

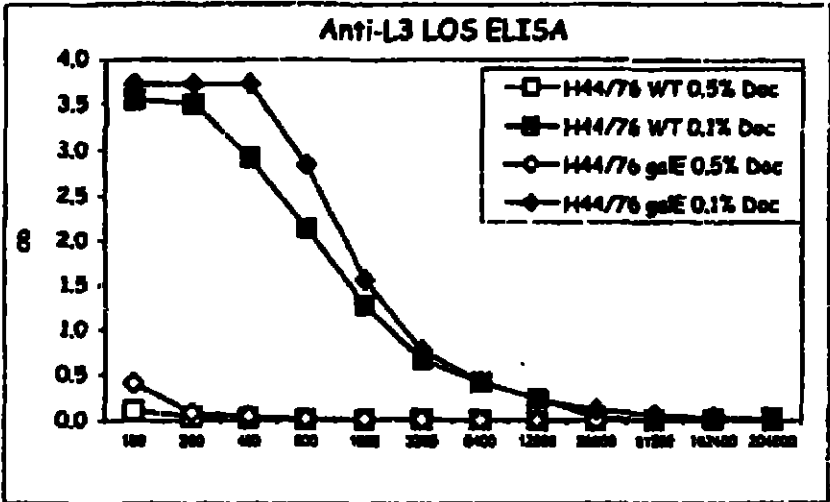


Figura 3B

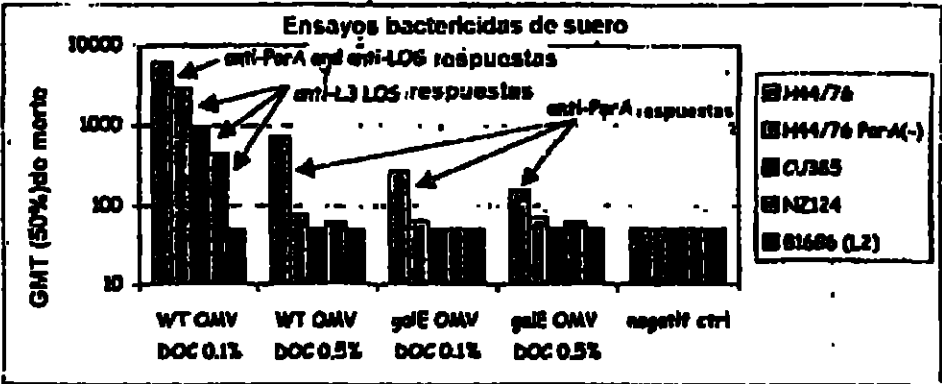


Figura 3C

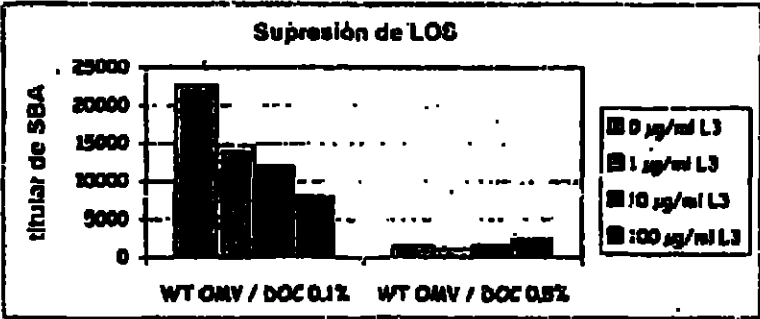
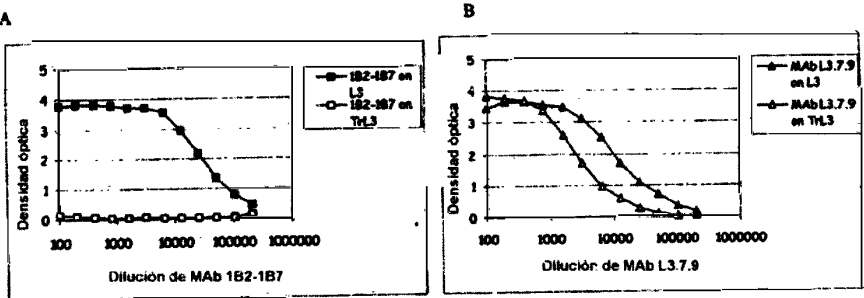


Figura 4



8

Figura 5A

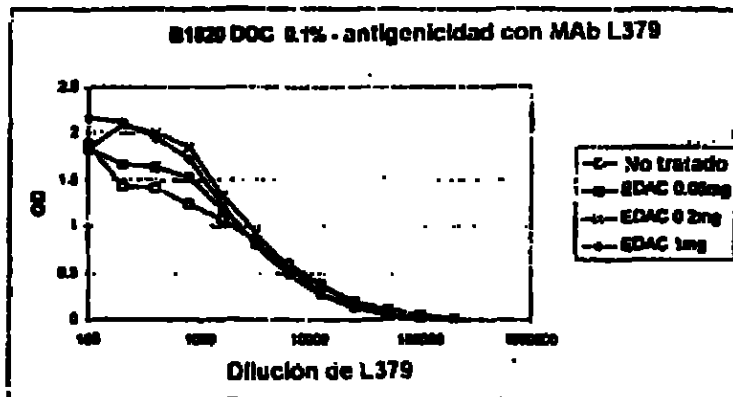


Figura 5B

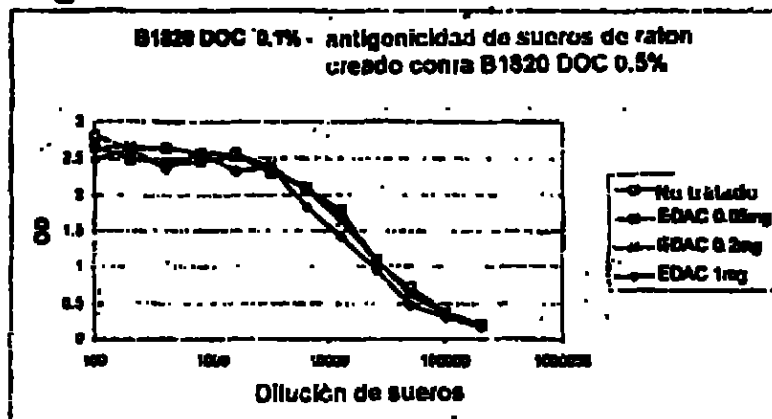


Figura 5C

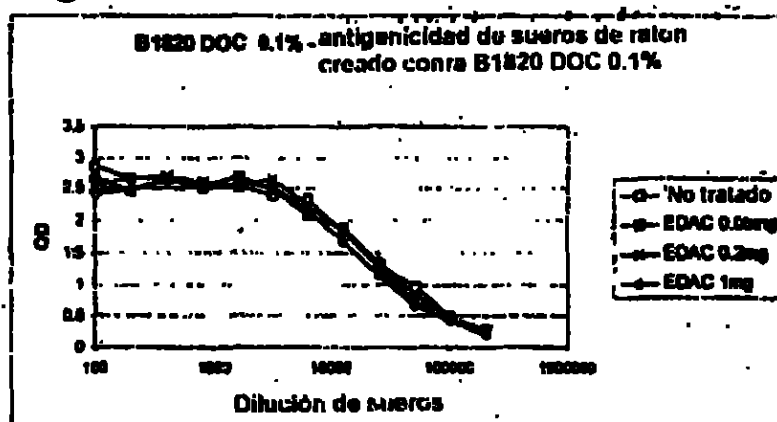


Figura 6A

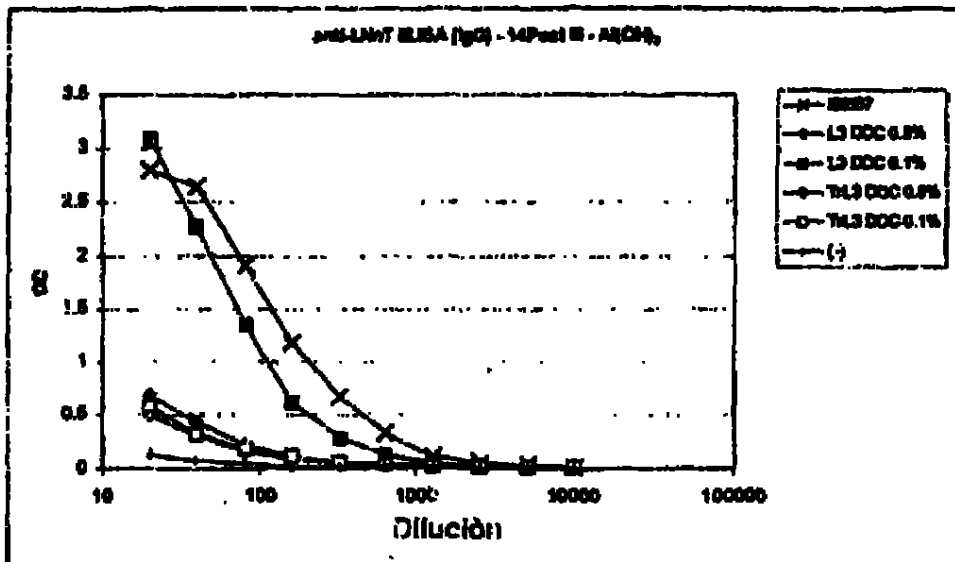
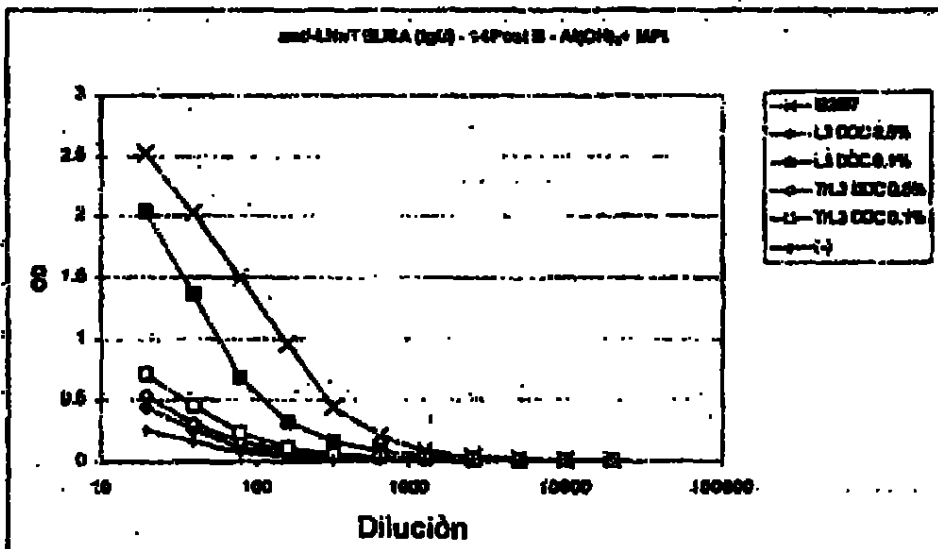


Figura 6B



**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] 30
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒ [x] 86
- ◆ 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 : 05007268 00000000 Folios: 91

Fecha (AMB): 2005-01-26 15:41:35

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAR

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Folio 93

2020
Bogotá, D.C.,

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

Oficio N°
... - 12462

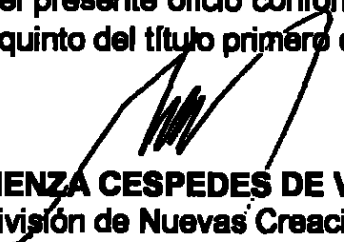
ASUNTO:	Radicación N°	05-7268
	Solicitud internacional	PCT/EP2003/008568
	Fecha inicio fase nacional	02/03/2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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).
- Si fuere el caso la solicitud debe contener la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional. (Art. 36.2.b) del tratado PCT).

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

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Sede CAN: Tr. 40A No. 36-50 Conmutador: 3820840
Fax: 382 26 95. Línea 8800-910 185
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia