



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

05-90928

21. EXPEDIENTE N° 05-90928

54. TÍTULO "PROCESO DE PURIFICACIÓN PARA CITOLISINA BACTERIANA"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 14/315

71. SOLICITANTE GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A

DOMICILIO RIXENSART, BÉLGICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. - 8 SET 2005

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

13-04-05

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

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

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart, Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica.

Teléfono: 3264270 **Fax:** 8089701

E-mail: jlicco@glaxosmithkline.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ **NIT** ☐
C.E. ☐ **Otro** ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLORENDA RECAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 8º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 **Fax:** 8089701

E-mail: jlicco@glaxosmithkline.com

C.C. ☒ **NIT** ☐
C.E. ☐ **Otro** ☐

Cual _____

Número 38.090.713 TP 63.216

4

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: BIEMANS, Rapha; GORAJ, Carino; MERTENS, Emmanuel y VANDERCAMMEN, Annick.

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/EP2004/002641

Fecha: 11/03/04

Publicación Internacional No. WO 2004/081615 A3

Fecha: 23/08/04

6

Título (84) "PROCESO DE PURIFICACIÓN PARA CITOLISINA BACTERIANA"

7

Clasificación Internacional (81) C07K 14/315 A61K 39/09 C12P 21/00
C07K 1/21

8

Prioridad

SI ☒ **NO** ☐

(33) País de Origen

GB
GB

(32) Fecha

13/03/03
13/03/03

(31) Número de Solicitud

0805701.8
0905762.4

9

Comprobante de Pago No. 05-03-085

Fecha: Septiembre 1 de 2005

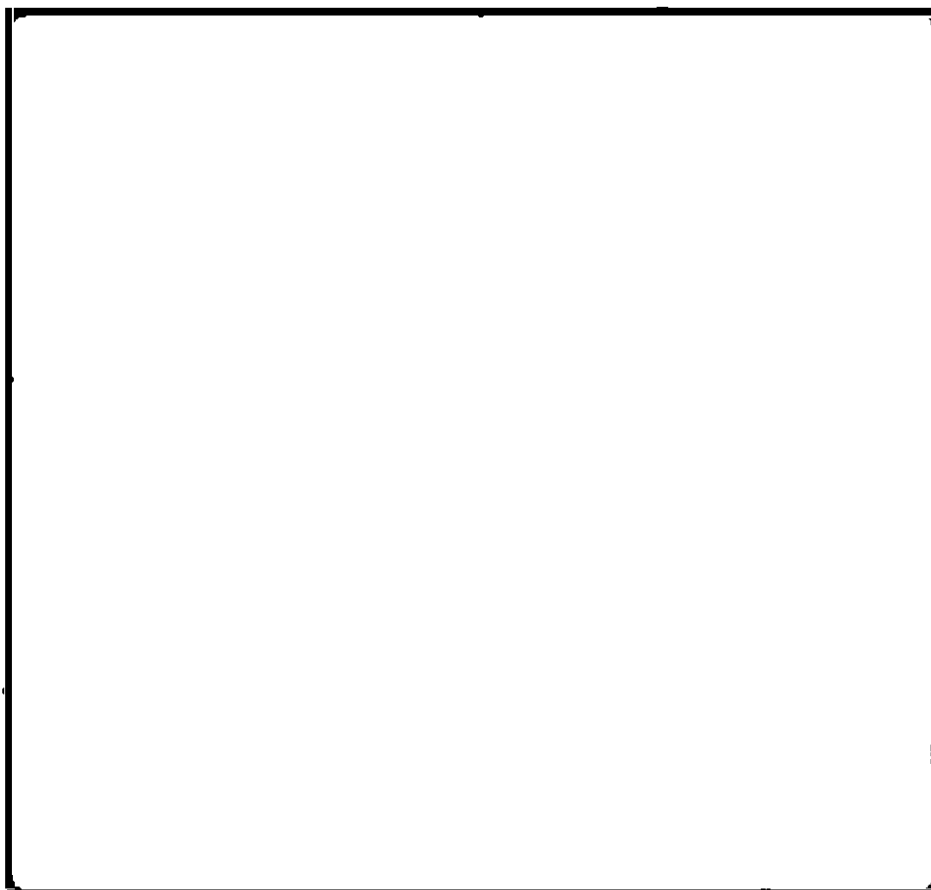
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documentos que acrediten la existencia y representación legal cuando los solicitantes sean personas jurídicas.
- ☒ Documentos 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 sobre patentabilidad.
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de cesión.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Aro 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, Notificación de registro de un cambio con su traducción, Capítulo Reivindicatorio como fue originalmente presentado en Fase Internacional con su traducción y Anexo Explicativo de Modificaciones u las Reivindicaciones.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Señale la concesión de la patente.

NOMBRE: ALICIA LOREDA RICALFTE.

FIRMA:

C.C. 39.890.713

T.P. 63.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 85099361 85099361

Folios 116

Fecha Emisión : 2005-09-06 17:21:22

Trámite : 011 PC/PATENT 379 PREC NECT 411 PRESENTA

Dependencia: 2000 D/TI/ION DE MARCAS COMERCIALES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 56,503

FECHA : SEPTIEMBRE 1 DE 2005

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Gr. PAGO
LLANES Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	950-00110-6	37307484	01/09/2005	4,908,040.00

CONCEPTO

CANT. REPARTICION	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 90005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE M	443,000.00
	TOTAL :	443,000.00

SUM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se 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 LLOREDA 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 manuscrita 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 13 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 u 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.

24

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



RECEIVED

1 AUG 23 1961

1. S. of P. R. D.

APOSTILLE

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

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

This public document is signed by

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

Certified/Attesté

5. at London/Londres 6. date 21 OCT 1961
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et de Commonwealth

8. Number/numéro **G 749037**

9. Stamp
Sceau



10. Signature **W G LASS**

W G LASS

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 competent authority 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 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento a 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 las facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; hacer solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular oposiciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; restaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago contemplado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; tener a la brevedad otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran 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, perdir 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

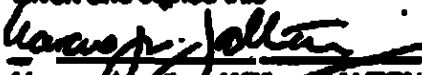
hereby appoint, **ALICIA LLOREDA** and/or **GUSTAVO TAMAYO** and/or **IGNACIO SANTAMARIA** and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial 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, resources 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 treatments 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 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 Winton William DALTON
Attorney and Authorized Officer

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

(as

Hoy de do 200 . compareció
a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
é 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 verifica 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
claros o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

6

Belgium

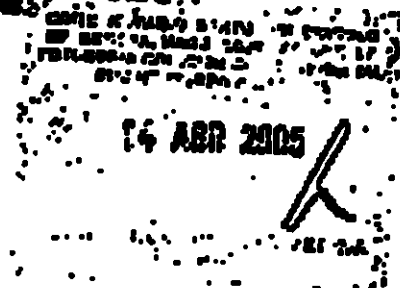
(as

On this day of 200 .
personally
came
is 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 with, a
Corporation organized and existing under the laws of
the Belgium, domiciled at the City of Rixensart,
Belgium, legally constituted for a period of time
not yet expired, which ~~contains~~ 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.



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. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Este documento público

2. ha sido firmado James Kerr Milligan

3. actuando como Notario Público

4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

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)

TRADUCCION OFICIAL
REGISTRACION 2177


ANITA SEPTEMBER DEL TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260547
A mta. Escobar
ZETA LAZAR MARTEL EN EL
PROCESO DE RESOLUCION
LAS FUENTES DE INFORMACION

SE DE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

ZONA SET 10 A D 47

11003

SEPTIEMBRE DE 1968
14 ABR 2013

Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

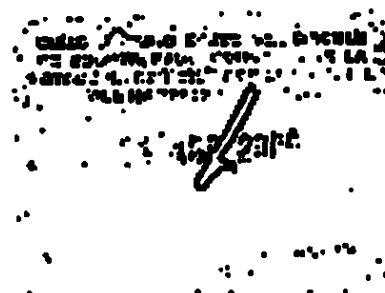
W. Gless
Por el Secretario de Estado

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.

TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Extracto de P. Folio 9

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORT DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Requisito de la búsqueda internacional según el artículo 17 del Tratado de Cooperación de Patentes	PARA FUTURAS ACCIONES (Forma PCT 43-A/2003) en el caso de que se solicite el examen de la patente
CLJ-V760139	Fecha de recepción de la solicitud internacional (PCT/Requisito)
En la fecha de recepción de la solicitud internacional	Fecha de prioridad (PCT/Requisito)
PCT/EP2004/002641	11/03/2004
13/03/2003	

G. AXONMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

Este Reporte de Búsqueda Internacional es el resultado de la búsqueda internacional de la solicitud de patente y se transmite al solicitante de la patente en virtud de la Ley de Patentes de la Oficina Española de Patentes y Marcas.

Se adjunta el Reporte de Búsqueda Internacional con el fin de que el solicitante pueda tomar las medidas que considere oportunas.

☒ El solicitante declara que ha leído el Reporte de Búsqueda Internacional y que no tiene objeciones a su contenido.

1. Resumen del Reporte

- ☒ En la búsqueda internacional se ha encontrado una o más referencias que se refieren a la invención objeto de la solicitud de patente.
- ☐ En la búsqueda internacional se ha encontrado una o más referencias que se refieren a la invención objeto de la solicitud de patente, pero que no se refieren a la invención objeto de la solicitud de patente.
- ☐ En la búsqueda internacional se ha encontrado una o más referencias que se refieren a la invención objeto de la solicitud de patente, pero que no se refieren a la invención objeto de la solicitud de patente.

- 2. ☐ Citas referenciadas en poder del solicitante (Ver Reglamento II).
- 3. ☐ Fecha de la invención (Ver Reglamento II).

4. Resumen del objeto.

- ☐ El objeto es el objeto de la solicitud de patente.
- ☒ El objeto es el objeto de la solicitud de patente.

PROCESO DE PUNTUACIÓN PARA CITOLISINA BACTERIANA

5. Resumen de la invención.

- ☒ La invención es el objeto de la solicitud de patente.
- ☐ La invención es el objeto de la solicitud de patente.

6. Resumen de las referencias.

a. El punto de las referencias que se publican con el número de la figura y el número de la página.

- ☐ Como la figura de la invención.
- ☐ Como la figura de la invención.
- ☐ Como la figura de la invención.

b. ☒ Ninguna de las figuras se puede considerar relevante.

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional PCT/EP2004/003641

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inencontrables (Continuación del Item 2 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 No.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad juzgue, a saber:
2. ☐ Reivindicaciones No.:
porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se pueda llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones No.:
porque una reivindicación es dependiente y no está diseñada de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla No. III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:
ver hoja 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 solo 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 No.:
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: así cubierto por las reivindicaciones No. :
1-36,38-54

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 múltiples (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, como sigue:

1. Reivindicaciones: 1-36,38-54

Procesos para purificar bacterias citolisinas y su uso en formulación de composiciones/ vacunas inmunogénicas

2. Reivindicaciones: 37

Procesos para detoxificar una bacteria toxina por modificación química.

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informe Internacional No
PCT/HF2004/002641

A CLASIFICACION DE VARIAS
PCT 00K14015 C12P2100 A61K3909 00K1420

Señal: la Clasificación de Patentes Internacional (CIP) o similar a clasificación, y la CIP

EL CAMPO BUSCADOS
Determinación relativa basada (patente) de las Patentes, según la clasificación de clasificación)

PCT 00K 13P 461K
Determinación basada sobre (la clasificación relativa sobre) de los datos de clasificación de los campos de búsqueda

Base de datos de clasificación consultada el 2004 la búsqueda internacional (código de la base de datos y, donde sea posible, la base de datos CIP)

PCT-System, EPO, WIPO, PCT, EPO, EPO

DOCUMENTOS CONSIDERADOS EN FAVOR

Categoría	Clasificación de datos, etc. Información, desde un apartado, de los datos de clasificación	Referencia a la clasificación No
X	WO 9605139 A (AMERICAN CYANAMID CO) 29 de febrero de 1996 (1996-02-29)	38-41, 49-54, 32-35
Y	página 1-página 3	
Y	MITCHELL T J ET AL: "EXPOSICIÓN DEL GRN DE PNEU MOLIBDENO EN ESCHERICHIA-COLI PURIFICACIÓN RÁPIDA Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS" BIOQUÍMICA ET BIOMÉDICA ACTA, vol. 1017, no.1, 1989, páginas 67-62, XP00245394 ISBN: 0006-3002 citado en la solicitud documento completo	1-36, 28-34

☒ En el presente G. se encuentran todos los documentos.

☒ En el presente se encuentran documentos de la familia de patentes.

A documento que define el estado general de la técnica al cual se le
asigna la prioridad

B documento anterior pero publicado en o después de la fecha de
presentación (artículo 29)

C documento que puede servir como referencia para la prioridad de una
solicitud o para servir como referencia para la prioridad de una
solicitud

D documento que no sirve a que (seale) de una, o más, solicitudes de
prioridad

E documento publicado antes de la fecha de presentación internacional
pero después de la fecha de prioridad internacional

F documento posterior publicado después de la fecha de presentación
internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la
solicitud para el cual se concede el presente documento que servirá
la prioridad

G documento de relevancia particular; la prioridad relativa al
presente documento es una o más prioridad internacional que comprende
un presente documento que el documento se trata solo

H documento de relevancia particular; la prioridad relativa al
presente documento es una o más prioridad internacional que comprende
el documento se trata con uno o más documentos, siendo dicho
combinación de la presente para el presente en la técnica

I documento relativo de la misma familia de patentes

Fecha de la búsqueda de los datos de la búsqueda internacional

Fecha de envío por correo del informe de búsqueda internacional

21 de junio de 2004

03/06/2004

Nombre y dirección de correo electrónico

Fecha de envío

Paragon Patent Office, P.O. Box 100000
St. Louis, MO 63101-0000
Tel. (+1-314) 340-2500, Fax. (+1-314) 340-2500
Fax. (+1-314) 340-2500

Schneider, P

Nombre y dirección de correo electrónico

Fecha de envío

15

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Grupos de trabajo No.
PC1/EP/2004/002641

C. (Categoría): DOCUMENTOS COMPLEMENTARIOS RELEVANTES

Categoría	Unidad de Clasificación, con frecuencia, desde una descripción de las características	Referencia a la publicación No.
Y	QUIROZ J A ET AL: "Cromatografía de interacción hidrofóbica de proteínas" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 87, no. 24 de mayo de 2001 (2001-05-04), página 143-159, XP004212077 ISSN: 0168-1656 página 144 página 149 página 150	1-36 38-54
A	WO 90/06951 A (PATON JAMES CLELAND; HANKMAN DAVID JOHN (A1.); MICHELL TIMOTHY JOHN (J) 28 de junio de 1990 (1990-06-28) citado en la solicitud página 8 página 9	
A	WO 96/23062 A (GENENCOR INT.) 1 de agosto de 1996 (1996-08-01) documento completo	
A	NAGAMINE HIDEAKI ET AL: "Interacción, una nueva citoquina específica para células humanas, secretada por el microorganismo intermedio UNS46 aislado de un absceso de hígado humano" 1996, IMMUNITION AND IMMUNITY, Vol. 64, NR. 8, PAGINA(S) 3093-3100, XP002285395 ISSN: 0019-9567/ página 3093-página 3094	
A	ROETTGER B F ET AL: "FENÓMENO DE ADSORCIÓN EN CROMATOGRAFÍA DE EXTRACCIÓN HIDROFÓBICA" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 5, no. 3, 1989, páginas 79-83, XP006037031 ISSN: 8759-7938 página 87: tabla 4	
2,A	JIANG X ET AL: "Expresión y purificación de Src 1 a partir de la anemia marítima según rosei como una proteína recombinante de no fusión" Noviembre 2003 (2003-11), PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, PAGINA(S) 161-166 , XP004469399 ISSN: 1046-5928 resumen	

PC1/EP/2004/002641

PC1/EP/2004/002641

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/002641

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda		Fecha de publicación		Clasificación de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9805859	A	29-02-1996	US AT AU AU CA DE DE DK EP ES GB JP PT WO	5665204 A 198851 T 784488 B2 3363605 A 2198251 A1 69519634 D1 69519634 T2 778781 T3 6778781 A1 2162421 T3 3835001 T3 18684717 T 778781 T 9885859 A1	15-10-1996 15-12-2000 22-04-1999 14-03-1996 29-02-1996 18-01-2001 13-06-2001 02-01-2001 18-06-1997 01-02-2001 30-03-2001 12-05-1998 30-03-2001 29-02-1996
WO 9805951	A	22-05-1998	AT AU AU AU BE CA DE DE DK EP ES FI HU JP JP MC NO RU US	285534 T 628861 B2 4766498 A 9886951 A1 51358 A3 2885784 A1 68829323 D1 68829323 T2 115881 A 0449856 A1 2160570 T3 183122 B1 68804 A2 4583048 T 3237842 B2 2178 A 912226 A 2121401 C1 6716432 B1	15-08-2001 13-08-1992 10-07-1998 28-06-1998 15-04-1999 16-06-1998 18-10-2001 18-04-2002 14-08-1991 09-10-1991 16-11-2001 30-04-1998 30-03-1992 16-07-1992 18-12-2001 22-05-1992 25-07-1991 10-11-1998 06-04-2004
WO 9823061	A	01-08-1996	BR CA EP FI JP WO US US	9686987 A 2211650 A1 8888855 A2 973123 A 18512758 T 9823061 A2 6431378 B1 6165786 A	04-11-1997 01-08-1996 12-11-1997 25-09-1997 08-12-1998 01-08-1996 13-08-2002 22-08-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

App. carrier or applicant's reference CI J VB60139	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, form S below.	
International application No. PCT/JP2004/00264	International filing date (day/month/year) 11/03/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 13/03/2003
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

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

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

☒ It is also accompanied by a copy of one or more documents cited in this report.

1. Basis of the report

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



The International search was carried out on the basis of a translation of the International application furnished to the Authority (Rule 23.1(c)).



With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application, see Box No. 1.

2.



Certain claims were found unsearchable (See Box 14).

3.



Unity of invention is lacking (see Box 15).

4.

With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



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

PURIFICATION PROCESS FOR BACTERIAL CYTOLYSIN

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established, according to Rule 36.2(a), by the Authority as appearing in Box No. 16. The applicant may, within one month next the date of mailing of this International Search Report, submit comments to the Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



as selected by the Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by the Authority, because this figure better characterizes the invention.



none of the figures is to be published with the abstract.

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 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 Yes:**
because they relate to a subject matter not required to be searched by the Authority, namely:
2. ☐ **Claims Non:**
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, namely:
3. ☐ **Claims Yes:**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 4(3).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

The International Searching Authority found multiple inventions in this International Application, as follows.

see additional sheet

1. ☐ As a required additional search fee was timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effecting 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 Yes.
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the prior art mentioned in the claims; it is covered by claims Non.

1-36,38-54

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ A protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-36,38-54

**process to purify bacterial cytotoxin and its use in
formulating immunogenic compositions/vaccines**

2. claim: 37

**process to detoxify a bacterial toxin by chemical
modification**

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/315 C12P21/00 A61K39/09 C07K1/20

According to International Classification (IPC) of technical fields, classification of IPC

B. FULLER SEARCHED

Various documents searched (classification system followed by class number symbols)

IPC 7 C07K C12P A61K

Doc number or no. of other (no number designation in the patent) and other documents are included in the whole document

Classifications have been obtained during the international search (more of data base and, when possible, search terms used)

EPO-internal, BIOSIS, MPI Data, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category - Citation of document, with reference, where appropriate, of the relevant passages

Relevance (to claim No)

X	WO 96/05859 A (AMERICAN CYANAMID CO) 29 February 1996 (1996-02-29)	38-41, 49-54
Y	page 1 - page 3	32-35
Y	----- MITCHELL T J ET AL: "EXPRESSION OF THE PNEUMOLYSIN GENE IN ESCHERICHIA-COLI RAPID PURIFICATION AND BIOLOGICAL PROPERTIES" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1007, no. 1, 1989, pages 67-72. XP082285394 ISSN: 0304-3866 cited in the application the whole document	1-36, 38-54

-/-

☒ Other documents are listed in the continuation of the C☒ Patent family members are listed in series.

D. OTHER CATEGORIES OF RELEVANT DOCUMENTS:

A documents during the period of the search and
not known to be of particular interestB documents during the period of the search and
not known to be of particular interestC documents during the period of the search and
not known to be of particular interestD documents during the period of the search and
not known to be of particular interestE documents during the period of the search and
not known to be of particular interestF documents during the period of the search and
not known to be of particular interestG documents during the period of the search and
not known to be of particular interestH documents during the period of the search and
not known to be of particular interestI documents during the period of the search and
not known to be of particular interest

Date of the actual search or of the international search

Date of the actual search or of the international search

23 June 2004

03 09 2004

Name and mailing address of the ISA

E. P. 2004 Patent Office, P. R. 2010 Patras 2
Tel. 2004 111 1111
Tel. 2004 111 1111, Te. 2004 111 1111
Fax: 2004 111 1111

Authorized Officer

Schneider, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2003)

C.J. 1994/000000 DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category 1: Citations of documents, with reasons, where appropriate, of the relevant passages

Relevant to class No

- | Category | Citations of documents, with reasons, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to class No |
|----------|--|------------------------|
| Y | <p>QUEIROZ J A ET AL: "Hydrophobic interaction chromatography of proteins" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 87, no. 2, 4 May 2001 (2001-05-04), pages 143-159, XP004232877
 ISSN: 0168-1656
 page 144
 page 149 - page 150</p> | <p>1-36,
38-54</p> |
| A | <p>WD 98/06951 A (PATCH JAMES CLELAND ; HAKSHAN DAVID JOHN (AJ); MITCHELL TIMOTHY JOHN ()) 20 June 1998 (1998-06-28) cited in the application
 page 8 - page 9</p> | |
| A | <p>WD 96/23061 A (GENENCOR INT) 1 August 1996 (1996-08-01) the whole document</p> | |
| A | <p>NAGAMUNE HIDEAKI ET AL: "Intermedilysin, a novel cytotoxin specific for human cells, secreted by Streptococcus intermedius UNS46 isolated from a human liver abscess" 1996, INFECTION AND IMMUNITY, VOL. 64, NR. 8, PAGE(S) 3093-3100 , XP002285395
 ISSN: 0919-9567
 page 3093 - page 3094</p> | |
| A | <p>ROETTERER B F ET AL: "ADSORPTION PHENOMENA IN HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 5, no. 3, 1989, pages 79-86, XP000032031
 ISSN: 8756-7938
 page 87; table 4</p> | |
| P,A | <p>JIANG X ET AL: "Expression and purification of Src : from sea anemone Sagartia rosea as a recombinant non-fusion protein" November 2003 (2003-11), PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, PAGE(S) 161-166 , XP004469399
 ISSN: 1046-5928
 abstract</p> | |

Patent document number in national report	Publication date	Priority number(s)	Publication date
WO 9605059	A	29-02-1996	US 5565204 A 15-10-1996 AT 190051 T 15-12-2000 AU 704450 B2 22-04-1999 AU 3363695 A 14-03-1996 CA 2198251 A1 29-02-1996 DE 69519634 D1 18-01-2001 DE 69519634 T2 13-06-2001 DK 778781 T3 02-01-2001 EP 0778781 A1 18-06-1997 ES 2152421 T3 01-02-2001 GR 3035081 T3 30-03-2001 JP 10584717 T 12-05-1998 PT 778781 T 30-03-2001 WO 9605059 A1 29-02-1996
WO 9606951	A	28-06-1996	AT 205534 T 15-09-2001 AU 626961 B2 13-08-1992 AU 4756490 A 10-07-1990 WO 9606951 A1 28-06-1996 BG 51350 A3 15-04-1993 CA 2005704 A1 16-06-1990 DE 68929323 D1 18-10-2001 DE 68929323 T2 18-04-2002 DK 115591 A 14-08-1991 EP 0449056 A1 09-10-1991 ES 2160570 T3 16-11-2001 FI 103122 B1 30-04-1999 HU 58804 A2 30-03-1992 JP 4503948 T 16-07-1992 JP 3237042 B2 10-12-2001 MC 2178 A 22-05-1992 NO 912226 A 25-07-1991 RU 2121481 C1 10-11-1998 US 6716432 B1 06-04-2004
WO 9623861	A	01-08-1996	BR 9606907 A 04-11-1997 CA 2211650 A1 01-08-1996 EP 0005055 A2 12-11-1997 FI 973123 A 25-09-1997 JP 10512758 T 08-12-1998 WO 9623861 A2 01-08-1996 US 6431370 B1 13-08-2002 US 6165706 A 22-08-2000

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Ginebra, Suiza

(51) Fecha de Publicación Internacional

27 de Septiembre de 2004 (23.09.2004)

(71) Número de Publicación Internacional

PCT

WO 2004/081515 A3

(11) Clasificación Internacional de Patentes: C07K 14/315,
C12P 21/00, A61K 39/09, C07K 1/20

(72) Agente: PRIVETT, Kathryn, Londres; GlaxoSmithKline, Corporate
Intellectual Property (GB925...), 990 Great West Road, Uxbridge,
Middlesex TW8 9QS (GB)

(12) Número de Solicitud Internacional: PCT/GB2004/003641

(31) Símbolos designados (a menos que sea indicado de otra manera para cada
clase de protección nacional específica): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CZ, DE, DK,
DM, DR, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GR, GU, HK, HN, IL, IN, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NA, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SI, SL, SV, TC, TM, TN, TR, TZ, UA, UK, US, UZ, VC,
VE, VG, VI, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de Registro Internacional: 11 de Marzo de 2004
(31.03.2004)

(23) Idioma de registro

inglés

(24) Idioma de Publicación

inglés

(30) Información de Prioridad

GB 057914 13 de marzo de 2003 (13.03.2003) GB
GB 057914 13 de marzo de 2003 (13.03.2003) GB

(31) Símbolos designados (a menos que sea indicado de otra manera para cada
clase de protección nacional específica): AR, AU, CA, CH, CN, DE,
DK, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, HN, IL, IN, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NA, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SI, SL, SV, TC, TM, TN, TR, TZ, UA, UK, US, UZ, VC,
VE, VG, VI, ZA, ZM, ZW.

(71) Solicitante (para todas las clases designadas excepto donde
se indique): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA
[GB/BE]: Rue de l'Industrie 89, B-1330 Rixensart (BE)

(72) Inventores:

Publicación

(74) Inventores/colaboradores (para Estados Unidos solamente):
MIZSIANS, Ralph [GB/BE]; GlaxoSmithKline
Biologicals S.A., Rue de l'Industrie 89, B-1330 Rixensart
(BE); GONAL, Martin [BE/BE]; GlaxoSmithKline
Biologicals S.A., Rue de l'Industrie 89, B-1330 Rixensart
(BE); MERTENS, Emmanuel [DE/DE];
GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Industrie 89,
B-1330 Rixensart (BE); VANDERCAMMEN, André
[BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de
l'Industrie 89, B-1330 Rixensart (BE).

-- con respecto de la divulgación internacional
-- sobre la explotación del objeto de la invención para modificar
las reivindicaciones y los procedimientos de acuerdo con el estado de
la técnica de modificación

(32) Fecha de publicación del informe de divulgación internacional
11 de noviembre de 2004

Para los códigos de las letras y otros símbolos, véase a "Las Notas
al pie sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada
hoja de registro de la Oficina PCT

(34) Título: PROCESO DE PURIFICACIÓN PARA CITOLISINA BACTERIANA

(37) Resumen: La presente invención está relacionada con un método para purificar citolisinas bacterianas tal como neumolisina neumocócica. Un solo paso de cromatografía produce purificación cuantitativa de la citolisina mediante el empleo de citolisina no agregada soluble a un material de cromatografía de interacción hidrofóbica en presencia de detergente y sal alta.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau

WO 2004/081515 A3

(43) International Publication Date
23 September 2004 (23.09.2004)

PCT

(70) International Publication Number
WO 2004/081515 A3

(51) International Patent Classification: C12P 21/00, A61K 38/00, C07K 1/30

(22) International Application Number: PCT/EP2004/002641

(21) International Filing Date: 11 March 2004 (11.03.2004)

(53) Filing Language: English

(56) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0304791.6 11 March 2003 (11.03.2003) EP
0303702.4 11 March 2003 (11.03.2003) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): CLARKSON-BLUTHKING, BIOLOGICALS N.V., B-1130 Rixensart (BE)

(72) Inventors; and
(73) Inventor/Applicant (for US only): BIERMAN, Ralph (inventor); Biobest-Klinz Biologics S.A., Rue de l'Industrie 31, B-1130 Rixensart (BE); CLARA, Kees (inventor); Biobest-Klinz Biologics S.A., Rue de l'Industrie 31, B-1130 Rixensart (BE); MERTENS, Hermann (inventor); Biobest-Klinz Biologics S.A., Rue de l'Industrie 31, B-1130 Rixensart (BE); VANDERCAAM-MAES, Anniek (inventor); Biobest-Klinz Biologics S.A., Rue de l'Industrie 31, B-1130 Rixensart (BE).

(74) Agent: PRYCHET, Kathryn, Looze; Biobest-Klinz, Corporate Intellectual Property (CIPUS), 980 Chateaufort Road, Belmont, MA 02458-1000 (US).

(52) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SV, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(54) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, JP, KE, LI, LU, NL, PT, RO, RU, SE, SK, TR, UA, UK, US), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GT, GW, IL, IN, KE, MG, ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).

Publication:
— 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

(58) Date of publication of the international search report: 11 November 2004

For two hour codes and other abbreviations, refer to the "Guidelines for the Preparation of the International Search Report" appearing in the latest issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PURIFICATION PROCESS FOR NATIONAL CYTULYIN

(57) Abstract: The present invention relates to a method for purifying bacterial cytolysins such as penicillins, penicillins. A single-step purification process is provided for purifying the cytolysin by blending soluble aggregated cytolysin in a hydrophobic solvent with a hydrophobic material in the presence of detergent and high salt.

WO 2004/081515 A3

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

DE LA OFICINA INTERNACIONAL

NOTIFICACION DE REGISTRO DE UN CAMBIO

(Regla 92 bis. 1 del PCT e
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Fecha de envío por correo (día/mes/año)
11 de Febrero de 2005 (11.02.2005)

Para:
PRIVETT, Kathryn, Louise
GlaxoSmithKline
Corporate Intellectual Property
(CN825.1)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS
Inglaterra

Archivo de referencia del solicitante o agente
C.LVB80138

Solicitud Internacional No.

PCT/EP2004/002641

NOTIFICACION IMPORTANTE

Fecha de registro internacional (día/mes/año)

11 de marzo de 2004 (11.03.2004)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y Dirección
GORAJ, Karne
GlaxoSmithKline Biologicals S.A.
Rue de l'Institut, 89
B-1330 Rixensart
Belgica

País de Nacionalidad País de Residencia
BE BE

No. Teléfono

No. Facsimile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona ☒ el nombre ☐ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y Dirección
GORAJ, Karne
GlaxoSmithKline Biologicals S.A.
Rue de l'Institut, 89
B-1330 Rixensart
Belgica

País de Nacionalidad País de Residencia
BE BE

No. Teléfono

No. Facsimile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina que recibe ☐ las Oficinas designadas relacionadas
☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional ☐ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☒ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ☐ otras:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.89.70

Forma PCT/IB/306 (marzo 1994)

Funcionario autorizado
Sylvie STENDER

Teléfono No. (41-22) 338 9026

000000788

PATENT COOPERATION TREATY

245

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

PRIVETT, Kathryn, Louise
GlaxoSmithKline
Corporate Intellectual Property
(CIN25.1)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW9 9GS
United Kingdom

Date of mailing (day/month/year)
11 February 2005 (11.02.2005)

Applicant's or agent's file reference
CLJ-VB00139

International application No.
PCT/EP2004/002841

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
11 March 2004 (11.03.2004)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

GORAJ, Karine
GlaxoSmithKline Biologiques S.A.
Rue de l'Institut, 89
B-1330 Rixensart
Belgium

State of origin

BE

State of residence

BE

Telephone No.

Facsimile No.

Telexprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

GORAJ, Corine
GlaxoSmithKline Biologiques S.A.
Rue de l'Institut, 89
B-1330 Rixensart
Belgium

GlaxoSmithKline
Corporate IP
Received BRENTFORD
21 FEB 2005

State of origin

BE

State of residence

BE

Telephone No.

Facsimile No.

Telexprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Silvie STENDER

Telex No. (41-22) 325 13 70

Telephone No. (41-22) 338 9825

Form PCT/IB/308 (March 1994)

52003105

**CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL JUNTO CON SU
TRADUCCION**

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para purificación de una citolisina bacteriana, que comprende los pasos de:

- a) cultivar un cultivo de células que expresen citolisina bacteriana.
- b) preparar un extracto a partir del cultivo que contiene citolisina bacteriana;
- c) enlazar la citolisina bacteriana de agregado soluble contenida en el extracto, en presencia de detergente, a un material de cromatografía de interacción hidrofóbica, bajo condiciones de sal alta (preferiblemente sal 0.6-2 M);
- d) eluir la citolisina bacteriana en presencia de detergente bajo condiciones de sal baja (preferiblemente sal 0-0.2M).

2. El proceso de la reivindicación 1, que además comprende los pasos de:

- e) remover el detergente de la citolisina bacteriana
- f) solubilizar la citolisina bacteriana mediante la adición de un desnaturalizante.
- g) remover el desnaturalizante de la citolisina bacteriana.

3. El proceso de la reivindicación 1 y 2, en donde la citolisina bacteriana es neumolisina neumocócica.

4. El proceso de las reivindicaciones 1-3, en donde el paso b) involucra el rompimiento mecánico de las células.

5. El proceso de las reivindicaciones 1-4, en donde el paso d) involucra el tratamiento con detergente.

6. El proceso de las reivindicaciones 1-5, en donde el mismo detergente está presente en los pasos c) y d).

7. El proceso de la reivindicación 5, en donde el mismo detergente está presente en los pasos b), c) y d).

8. El proceso de las reivindicaciones 1-7, en donde el detergente está presente en una concentración entre 0.1 y 5% (p/v).

9. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el paso b) involucra la centrifugación de material de célula deteriorado y recolección de un sobrenadante como el extracto del paso c).

10. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el material de cromatografía de interacción hidrofóbica usado en el paso c) contiene grupos aromáticos.

11. El proceso de la reivindicación 10, en donde el material de cromatografía hidrofóbica es fase sfera.

12. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el detergente presente en la solución usada en el paso c) y/o paso d) es un detergente alifático.

13. El proceso de la reivindicación 12, en donde el detergente alifático es un detergente que es capaz de reducir el tamaño de los agregados de neumofina para hacerlos solubles.

14. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el detergente es lauroil sarcosinato de sodio.

15. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las condiciones de sal alta del paso c) contienen sal entre 0.6 M y 2M.

16. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde la solución usada en el paso c) y/o d) contiene una sal seleccionada del grupo consistente de cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, fosfato de amonio.

17. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las condiciones usadas en el paso c) y/o paso d) están entre pH 6-8, preferiblemente aproximadamente pH 7.

18. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las condiciones usadas en el paso d) contienen sal 0-0.1 M.

19. El proceso de la reivindicación 18, en donde las condiciones usadas en el paso d) contienen sal 0-40 mM.

20. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el paso e) involucra la remoción de detergente mediante diafiltración o diálisis.

21. El proceso de la reivindicación 20, en donde la diafiltración/diálisis es contra un amortiguador bajo en sal de pH 8-10, preferiblemente aproximadamente pH 9.

22. El proceso de las reivindicaciones 2-21, en donde el paso f) involucra la desnaturalización de citolisina bacteriana mediante la adición de un desnaturalizante, y el paso g) involucra el repliegue de la citolisina bacteriana mediante la remoción gradual del desnaturalizante.

23. El proceso de las reivindicaciones 2-22, en donde el desnaturalizante usado en el paso f) es clorhidrato de guanidina.

24. El proceso de la reivindicación 23, en donde se usa clorhidrato de guanidina 5-8 M.

25. El proceso de las reivindicaciones 22-24, e donde la citolisina bacteriana es contactada con urea 5-9 M durante el paso f).

26. El proceso de la reivindicación 25, en donde el paso f) involucra contactar la citolisina bacteriana con clorhidrato de guanidina 5-8 M, seguido del intercambio del clorhidrato de guanidina por urea 5-9M.

27. El proceso de las reivindicaciones 22-26, en donde un agente reductor está presente durante al menos parte de los pasos f) y g).

28. El proceso de la reivindicación 27, en donde el agente reductor es DTT 0.1-10 mM, preferiblemente aproximadamente DTT 1 mM.

29. El proceso de la reivindicación 2-28, en donde en el paso g), la citolisina bacteriana es replegada de forma que su actividad hemolítica es re-establecida por encima del 50% de la de la proteína plegada.

30. El proceso de la reivindicación 2-29, en donde el paso g) involucra la remoción del desnaturalizante mediante diafiltración o diálisis.

31. El proceso de la reivindicación 30, en donde la diafiltración o diálisis es contra una solución de pH 7-9.

32. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende un paso adicional de destoxificación de la citolisina bacteriana mediante tratamiento químico.

33. El proceso de la reivindicación 32, en donde el tratamiento químico involucra el uso de un agente de reticulación.

34. El proceso de la reivindicación 33, en donde el reactivo de reticulación contiene uno o más químicos seleccionados del grupo consistente de formaldehído, glutaraldehído, N-hidroxisuccinimido ésteres y GMBS.

35. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende un paso adicional de conjugar la citolisina bacteriana a un polisacárido capsular bacteriano.

36. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende un paso adicional de formular la citolisina bacteriana en una composición de vacuna con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

37. Un proceso para la destoxificación de una toxina bacteriana que comprende el paso de tratar una toxina con un compuesto químico que es reactivo con grupos amina primaria, en donde más del 50% de la toxina

retiene un peso molecular entre el 20% de su peso molecular original después del tratamiento, como se evaluó mediante SDS-PAGE.

38. Una citolisina bacteriana purificada mediante el método de la reivindicación 1-37.

39. La citolisina bacteriana de la reivindicación 38, en donde la citolisina bacteriana es neumolisina neumocócica.

40. Un conjugado neumolisina-polisacárido capsular bacteriano preparado mediante el proceso de la reivindicación 35, en donde la citolisina bacteriana es neumolisina neumocócica.

41. Una composición inmunogénica que comprende neumolisina o conjugado neumolisina-polisacárido bacteriano de la reivindicación 39 o 40.

42. La composición inmunogénica de la reivindicación 41, que además comprende proteína A enlazante de colina, o un fragmento inmunogénico de esta.

43. La composición inmunogénica de la reivindicación 41 o 42, que además comprende uno o más de PhtA, PhtB, PhtD o PhtE, o un fragmento inmunogénico de estas.

44. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 41-43, que además comprende un antígeno de *Haemophilus influenzae* no clasificable (NtHi).

45. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 41-43, que además comprende un antígeno de *Moraxella catarrhalis*.

46. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 41-45, que además comprende un antígeno de RSV.

47. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 41-46, que además comprende un antígeno del virus de parainfluenza.

48. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 41-47, que además comprende un antígeno del virus de influenza.

49. Una vacuna que comprende neumolisina o conjugado de neumolisina-polisacárido bacteriano de la reivindicación 39 o 40, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de las reivindicaciones 41-48, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

51. Un proceso para hacer la vacuna de la reivindicación 50, que comprende el proceso de la reivindicación 36, en donde la citolisina bacteriana es neumolisina neumocócica, y un paso adicional de agregar uno o más de los componentes adicionales de las reivindicaciones 42-48.

52. Una vacuna preparada mediante el proceso de la reivindicación 36 o 51.

53. Un método para el tratamiento o prevención de infección de *Streptococcus Pneumoniae*, que comprende la administración de la vacuna de la reivindicación 49, 50 o 52 a un huésped en necesidad de esta.

54. Un uso de la neumolisina o conjugado de neumolisina-polisacárido bacteriano de la reivindicación 39 o 40, en la preparación de una vacuna para el tratamiento o prevención de infección de *Streptococcus pneumoniae*.

CLAIMS

1. A process for purification of a bacterial cytolysin comprising the steps of:
 - a) growing a culture of cells expressing bacterial cytolysin;
 - b) preparing an extract from the culture containing bacterial cytolysin;
 - c) binding soluble aggregated bacterial cytolysin contained in the extract in the presence of detergent to a hydrophobic interaction chromatography material under high salt (preferably 0.6-2M salt) conditions;
 - d) eluting bacterial cytolysin in the presence of detergent under low salt (preferably 0-0.2M salt) conditions.
2. The process of claim 1 further comprising the steps of:
 - e) removing detergent from the bacterial cytolysin
 - f) solubilising the bacterial cytolysin by addition of a denaturant;
 - g) removing the denaturant from the bacterial cytolysin.
3. The process of claim 1 or 2 wherein the bacterial cytolysin is pneumococcal pneumolysin.
4. The process of claims 1-3 wherein step b) involves mechanically breaking the cells.
5. The process of claims 1-4 wherein step b) involves treatment with detergent.
6. The process of claims 1-5 wherein the same detergent is present in steps c) and d).
7. The process of claim 5 wherein the same detergent is present in steps b), c) and d).
8. The process of claims 1-7 wherein the detergent is present in a concentration of between 0.1 and 5% (w/v).
9. The process of any preceding claim wherein step b) involves centrifugation of disrupted cell material and collection of a supernatant as the extract of step c).
10. The process of any preceding claim wherein the hydrophobic interaction chromatography material used in step c) contains aromatic groups.

33

11. The process of claim 10 wherein the hydrophobic chromatography material is phenyl-sepharose.
- 5 12. The process of any preceding claim wherein the detergent present in the solution used in step c) and/or step d) is: an aliphatic detergent.
13. The process of claim 12 wherein the aliphatic detergent is a detergent that is able to reduce the size of pneumolysin aggregates to render them soluble.
- 10 14. The process of any preceding claim wherein the detergent is sodium lauroyl sarcosinate.
- 15 15. The process of any preceding claim wherein the high salt conditions of step c) contains between 0.6M and 2M salt.
16. The process of any preceding claim wherein the solution used in step c) and/or d) contains a salt selected from the group consisting of sodium chloride, magnesium chloride, ammonium chloride, sodium sulphate, magnesium sulphate, ammonium sulphate, sodium phosphate, magnesium phosphate, ammonium phosphate.
- 20 17. The process of any preceding claim wherein the conditions used in step c) and/or step d) are between pH 6-8, preferably around pH 7.
- 25 18. The process of any preceding claim wherein the conditions used in step d) contain 0 - 0.1M salt.
19. The process of claim 18 wherein the conditions used in step d) contain 0-40mM salt.
- 30 20. The process of any preceding claim wherein step e) involves the removal of detergent by diafiltration or dialysis.
21. The process of claim 20 wherein the diafiltration/dialysis is against a low salt buffer of pH 8-10, preferably around pH 9.

36

22. The process of claims 2-21 wherein step f) involves denaturing the bacterial cytolysin by addition of a denaturant and step g) involves refolding the bacterial cytolysin by gradually removing the denaturant

5 23. The process of claims 2-22 wherein the denaturant used in step f) is guanidine hydrochloride.

24. The process of claim 23 wherein 5-8M guanidine hydrochloride is used.

10 25. The process of claims 22-24 wherein the bacterial cytolysin is contacted with 5-9M urea during step f).

15 26. The process of claim 25 wherein step f) involves contacting bacterial cytolysin with 5-8M guanidine hydrochloride followed by exchanging the guanidine hydrochloride for 5-9M urea.

27. The process of claims 22-26 wherein a reducing agent is present during at least part of steps f) and g).

20 28. The process of claim 27, wherein the reducing agent is 0.1-10mM DTT, preferably around 1mM DTT.

25 29. The process of claim 2-28 wherein in step g) bacterial cytolysin is refolded so that its haemolytic activity is restored to above 50% of that of the folded protein.

30 30. The process of claim 2-29 wherein step g) involves removal of the denaturant by diafiltration or dialysis.

31. The process of claim 30 wherein diafiltration or dialysis is against a solution of pH 7-9.

32. The process of any preceding claim comprising a further step of detoxifying the bacterial cytolysin by chemical treatment.

35 33. The process of claim 32 wherein the chemical treatment involves use of a crosslinking agent.

34. The process of claim 33 wherein the crosslinking reagent contains one or more chemicals selected from the group consisting of: formaldehyde, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimido esters and GMBS.

5 35. The process of any preceding claim comprising a further step of conjugating the bacterial cytolysin to a bacterial capsular polysaccharide.

36. The process of any preceding claim comprising a further step of formulating bacterial cytolysin into a vaccine composition with a pharmaceutically acceptable excipient.

10

37. A process for detoxification of a bacterial toxin comprising treating a toxin with a chemical compound that is reactive with primary amine groups wherein over 50% of the toxin retains a molecular weight within 20% of its original molecular weight after treatment, as assessed by SDS-PAGE.

15

38. A bacterial cytolysin purified by the method of claim 1-37.

39. The bacterial cytolysin of claim 38 wherein the bacterial cytolysin is pneumococcal pneumolysin.

20

40. A pneumolysin-bacterial capsular polysaccharide conjugate made by the process of claim 35, wherein the bacterial cytolysin is pneumococcal pneumolysin.

25 41. An immunogenic composition comprising pneumolysin or pneumolysin-bacterial polysaccharide conjugate of claim 39 or 40.

42. The immunogenic composition of claim 41, further comprising choline binding protein A or an immunogenic fragment thereof.

30 43. The immunogenic composition of claim 41 or 42 further comprising one or more of PhtA, PhtB, PhtD or PhtE or an immunogenic fragment thereof.

44. The immunogenic composition of claims 41-43 further comprising an antigen from non typeable *Haemophilus influenzae* (NthI).

35

36

45. The immunogenic composition of claim 41-44 further comprising an antigen from *Moraxella catarrhalis*.

46. The immunogenic composition of claim 41-45 further comprising an antigen from RSV.

47. The immunogenic composition of claim 41-46 further comprising an antigen from parainfluenza virus.

48. The Immunogenic composition of claim 41-47 further comprising an antigen from influenza virus.

49. A vaccine comprising pneumolysin or pneumolysin-bacterial polysaccharide conjugate of claim 39 or 40 and a pharmaceutically acceptable excipient.

50. A vaccine comprising the immunogenic composition of claims 41-48 and a pharmaceutically acceptable excipient.

51. A process of making the vaccine of claim 50 comprising the process of claim 36 wherein the bacterial cytotoxin is pneumococcal pneumolysin and an additional step of adding one or more of the additional components of claims 42-48.

52. A vaccine made by the process of claim 36 or 51.

53. A method of treatment or prevention of *Streptococcus pneumoniae* infection comprising administration of the vaccine of claim 49, 50 or 52 to a host in need thereof.

54. A use of the pneumolysin or pneumolysin-bacterial polysaccharide conjugate of claim 39 or 40 in the preparation of a vaccine for the treatment or prevention of *Streptococcus pneumoniae* infection.

37

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente CLJ/VB60139	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Forma PCT/IPEA/416	
Solicitud Internacional No. PCT/EP 2004/002641	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 11.03.2004	Fecha de prioridad (día/mes/año) 13.03.2003
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C07K14/315, C12P21/00, A61K39/09, C07K1/20		
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. et al		
1. Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>7</u> hojas, incluyendo esta carátula. 3. Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden: a. ☒ (enviado al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de <u>4</u> hojas, como sigue: ☒ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas). ☐ hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No. I y la Casilla Suplementaria. b. ☐ (enviado únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) _____, que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).		
4. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: ☒ Casilla No. I Bases del Reporte ☐ Casilla No. II Prioridad ☒ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial. ☒ Casilla No. IV Falta de unidad de invención ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación. ☐ Casilla No. VI Ciertos documentos citados ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional ☐ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional		
Fecha de presentación de la demanda 02.12.2004	Fecha de terminación de este reporte 10.06.2005	
Nombre y dirección de correo de la IPEA European Patent Office-P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk-Pays Bas Tel. +31 70 340-2040 Tx:31 651 epo nl Fax +31 70 340-3016	Funcionario autorizado Schneider, P Teléfono No. +31 70 340-4523	

Casilla No. I Bases del reporte

1. Respecto al idioma, este reporte se basó en la solicitud internacional en el idioma en el cual fue presentada, a menos que se indique lo contrario según este ítem.

☐ Este Reporte se basó en una traducción del idioma original al siguiente idioma _____, el cual es el idioma de una traducción suministrada para los propósitos de:

- ☐ búsqueda internacional (según la Regla 12.3. y 23.1 (b)).
- ☐ publicación de la solicitud internacional (según la Regla 12.4)
- ☐ examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).

2. Respecto a los elementos de la solicitud internacional este Reporte se basó en (hojas reemplazadas que han sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación según Artículo 14, son referidas en este reporte como "originalmente presentadas" y no son anexadas a este reporte):

Descripción, páginas

1-36 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, números

1-42 recibido el 02.12.2004 con carta del 01.12.2004

Dibujos, hojas

1/5-5/5 como se presentaron originalmente

☐ la secuencia numerada y/o alguna tabla(s)-ver Casilla Suplementaria a la Secuencia Numerada

3. ☒ Las modificaciones resultaron en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☒ las reivindicaciones, Nos.43-54
- ☐ los dibujos, hojas/figuras
- ☐ listado de secuencia (especificar)
- ☐ cualquier tabla(s) relacionadas con la serie de listados (especificar)

4. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (alguno de) los anexos corregidos a este reporte y numerado antes no ha sido hecho, desde que ellos han sido considerados a través de la presentación original, como esta indicado en la casilla suplementaria (regla 70.2C)..

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/figuras
- ☐ secuencia que enumera (especificar)
- ☐ algunas tabla(s) relatando secuencia numerada (especificar)

*si el ítem 4 aplica, algunas o todas aquellas hojas pueden ser marcadas "reemplazadas"

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

Las cuestiones de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar nivel inventivo (ser no obvia) o ser industrialmente aplicable no han sido examinadas respecto a:

☐ toda la solicitud internacional

☒ las reivindicaciones Nos. 42

porque:

☐ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. se relacionan con la siguiente materia objeto las cuales no requieren examen preliminar internacional (*especifique*):

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):

☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa.

☒ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos. 42

☐ el listado de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos no cumple con la norma proporcionada por el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:

la forma escrita

☐ no ha sido suministrada

☐ no cumple con la norma

la forma legible en computador

☐ no ha sido suministrada

☐ no cumple con la norma

☐ las tablas relacionadas con el listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos, si únicamente en forma legible en computador, no cumple con los requerimientos técnicos proporcionados por el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ ver Casilla Suplementaria para detalles adicionales.

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD**

Solicitud internacional No.
PCT/EP2004/002641

Casilla No. IV Falta de Unidad en la invención

1. ☒ En respuesta a la invitación a restringir o pagar tasas adicionales, el solicitante ha:
 - ☐ Restringido las reivindicaciones
 - ☐ Pagado tasas adicionales
 - ☐ Pagado tasas adicionales bajo protesta
 - ☒ Ni restringido ni pagado tasas adicionales
2. ☐ Esta Autoridad encontró que el requisito de unidad de invención no se cumple y decidió, de acuerdo con la Regla 68.1, no invitar al solicitante a restringirlo o pagar tasas adicionales.
3. Esta Autoridad considera que el requisito de unidad de invención de acuerdo con las Reglas 13.1, 13.2 y 13.3 es:
 - ☐ Cumplido
 - ☒ No cumplido por las siguientes razones:
ver siguiente hoja
4. En consecuencia, las siguientes partes de la solicitud internacional, fueron el objeto del Examen Preliminar Internacional para establecer este informe
 - ☐ Todas la partes
 - ☒ Las partes que se relacionan a las reivindicaciones Nos. 1-41

Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones 1-41 No: Reivindicaciones
Nivel inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones 1-41 No: Reivindicaciones
Aplicabilidad industrial (IA)	Si: Reivindicaciones 1-41 No: Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones (Regla 70.7):

ver siguiente hoja

Re Item IV

Falta de Unidad de Invención

Esta Autoridad considera que hay 2 invenciones cubiertas por las reivindicaciones como se indica en la forma PCT/ISA/206.

Razón por la cual las invenciones no están tan relacionadas como para formar un solo concepto inventivo general, como lo requiere la Regla 13.1 PCT, ver también Forma PCT/ISA/206.

Re Item V

Declaración Razonada con respecto a la novedad, mérito inventivo o aplicabilidad Industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración

Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: MITCHELL T J ET AL.; BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1007, no. 1, 1989, páginas 67-72.

D2: QUEIROZ J A ET AL.; JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 87, no. 2, Mayo 4 de 2001 (2001-05-04), páginas 143-159.

D3: WO 96/05859 A (AMERICAN CYANAMID CO), Febrero 29 de 1996 (1996-02-29)

D4: Roettger et al.; Biotechnology Progress, 1989, vol. 5, no. 3, páginas 79-88.

1 Enmiendas (Art 28 PCT)

Se ha registrado un nuevo juego de enmiendas con una carta fechada 01.12.2004, revividas el 02.12.2004. Estas enmiendas se han basado en la solicitud como fue registrada, y por lo tanto se consideran permitidas bajo Art. 28(2) PCT.

2 Novedad (Art. 33(2) PCT)

La presente solicitud revela un proceso para purificación de una citolisina bacteriana, que comprende i.a., el paso de enlazar la citolisina de agregado soluble en presencia de detergente, a un material de cromatografía de interacción hidrofóbico, bajo condiciones de sal alta de 0.6 a 2 M, como el único paso cromatográfico del procedimiento.

No se ha revelado tal proceso para la purificación de citolisina bacteriana. El método establecido usado en la técnica está descrito en D1 y usa una cromatografía de sal baja a 250 mM y un segundo paso cromatográfico sin detergente.

Como consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 1 a 41 es nuevo bajo el Art. 33(2) PCT.

3 Nivel Inventivo (Art. 33(3) PCT)

3.1 El Documento D1 es la técnica previa más cercada al objeto de la reivindicación independiente 1 y revela la purificación de polipéptidos de neumolisina usando interacción hidrofóbica sobre fenil-sefarosa (p. 68) de la cual, el objeto de la reivindicación 1 difiere en que se usa una concentración de sal más alta para enlazar la neumolisina al material cromatográfico, y que está presente un detergente.

El efecto técnico que está asociado con dicha diferencia es que no se realiza un segundo paso cromatográfico para aumentar la concentración de neumolisina. El problema a resolver mediante la presente invención es la provisión de un procedimiento cromatográfico simplificado para purificar neumolisina/citolisina.

3.2 Como la citolisina es de valor inmunogénico conocido, existe una necesidad constante en la técnica de optimizar el procedimiento de purificación. El experto sabe acerca del problema a ser resuelto.

A partir de la técnica, el experto también sabe que en D1 se usó una concentración de sal relativamente baja (205 mM) (ver e.g., D4, p. 87, Tabla 4, 0.5 a 1.3 M) para enlazar la neumolisina. Por lo tanto él consideraría usar un rango mayor de concentraciones, e.g., el rango de la presente solicitud. Sin embargo al hacer esto, el experto reconocería el problema de solubilidad de agregación de las moléculas de proteína como se revela en la presente solicitud (ver, e.g., p.1). Como esto tiene impactos negativos series en el proceso de purificación entero, el experto volvería a la concentración en donde no ocurre agregación, i.e., a la baja concentración de sal conocida en la técnica.

3.3 En la presente solicitud, estos problemas de solubilidad fueron parcialmente compensados al adicionar un detergente. Como consecuencia, los agregados permanecieron pequeños y solubles, y el paso cromatográfico puede hacerse bajo condiciones de sal alta (NaCl 1.0 M). Esto conduce al efecto sorprendente que solamente un paso de purificación conduce a la purificación de la proteína. Aunque se conocía en la técnica que los problemas de solubilidad pueden ser resueltos usando detergentes (D2, p. 150), también es conocido del mismo pasaje de D2 que el detergente también se usa para despojar columnas de cromatografía, i.e., para eluir todas las proteínas enlazadas, que por supuesto, no es deseable en el paso de enlace al material de la columna.

Tomados juntos, no parece probable que el experto, tratando de resolver el problema propuesto, tratara de trabajar a concentración alta de sal con un detergente, teniendo en cuenta los riesgos y sin tener expectativas razonables de éxito al mejorar el método comparado con el método establecido a concentración baja de sal.

Por lo tanto, se reconoce un mérito inventivo bajo el Art.33(3) PCT.

4 Aplicación Industrial (Art. 33(4) PCT)

Las reivindicaciones presentes cumplen el requisito de aplicabilidad industrial (Art. 33(4) PCT).

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para purificación de una citolisina bacteriana comprendiendo las etapas de:
 - a) desarrollar un cultivo de células que expresan citolisina bacteriana;
 - b) preparar un extracto del cultivo conteniendo citolisina bacteriana;
 - c) unir citolisina bacteriana agregada soluble, contenida en el extracto, en la presencia de detergente a un material de cromatografía de interacción hidrofóbica bajo condiciones ricas en sal (preferentemente 0.6-2M);
 - d) eluir citolisina bacteriana en la presencia de detergente bajo condiciones bajas en sal (preferentemente 0-0.2M).
2. El proceso según la reivindicación 1 comprendiendo además las etapas de:
 - e) remover detergente de la citolisina bacteriana
 - f) solubilizar la citolisina bacteriana por adición de un desnaturalizante;
 - g) remover el desnaturalizante de la citolisina bacteriana.
3. El proceso según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la citolisina bacteriana es neumolisina neumocócica.
4. El proceso según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque la etapa b) incluye rompimiento mecánico de las células.
5. El proceso según las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque la etapa b) incluye el tratamiento con detergente.
6. El proceso según las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el mismo detergente está presente en las etapas c) y d).
7. El proceso según la reivindicación 5, caracterizado porque el mismo detergente está presente en las etapas b), c) y d).
8. El proceso según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque el detergente está presente en una concentración de entre 0.1 y 5% (p/v).
9. El proceso según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque la etapa b) incluye centrifugación de material celular interrumpido y recolección de un sobrenadante como el extracto de la etapa c).

HOJA ENMENDADA

10. El proceso según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque el material de cromatografía de interacción hidrofóbica utilizado en la etapa c) contiene grupos aromáticos.
11. El proceso según la reivindicación 10, caracterizado porque el material de cromatografía hidrofóbica es fenil-sefarosa.
12. El proceso según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque el detergente presente en la solución utilizada en la etapa c) y/o etapa d) es un detergente alifático.
13. El proceso según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque el detergente es sarcosinato de lauroil de sodio.
14. El proceso según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque las condiciones ricas en sal de la etapa c) contienen entre 0.6M y 2M sal.
15. El proceso según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque la solución utilizada en la etapa c) y/o d) contiene una sal seleccionada del grupo que consiste de cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, fosfato de amonio.
16. El proceso según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque las condiciones utilizadas en la etapa c) y/o etapa d) son entre pH 6.8, preferentemente aproximadamente pH 7.
17. El proceso según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque las condiciones utilizadas en la etapa d) contienen 0-0.1M sal.
18. El proceso según la reivindicación 17, caracterizado porque las condiciones utilizadas en la etapa d) contienen 0-40mM sal.
19. El proceso según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque la etapa e) incluye el retiro de detergente por diafiltración o diálisis.
20. El proceso según la reivindicación 19, caracterizado porque la diafiltración/diálisis es contra un regulador bajo en sal de pH 8-10, preferentemente aproximadamente pH 9.

21. El proceso según las reivindicaciones 2-20, caracterizado porque la etapa f) incluye desnaturalizar la citolisina bacteriana por la adición de un desnaturalizante y etapa g) incluye replegar la citolisina bacteriana al remover gradualmente el desnaturalizante.
22. El proceso según las reivindicaciones 2-21, caracterizado porque el desnaturalizante utilizado en la etapa f) es hidrocioruro de guanidina.
23. El proceso según la reivindicación 22, caracterizado porque 5-8M hidrocioruro de guanidina se utiliza.
24. El proceso según las reivindicaciones 22-24, caracterizado porque la citolisina bacteriana se contacta con 5-9M urea durante la etapa f).
25. El proceso según la reivindicación 24, caracterizado porque la etapa f) incluye contactar citolisina bacteriana con 5-8M hidrocioruro de guanidina seguido por intercambio del hidrocioruro de guanidina por 5-9M urea.
26. El proceso según las reivindicaciones 21-25, caracterizado porque un agente reductor está presente durante al menos parte de las etapas f) y g).
27. El proceso según la reivindicación 26, caracterizado porque el agente reductor es 0.1-10mM DTT, preferentemente aproximadamente 1mM DTT.
28. El proceso según las reivindicaciones 2-27, caracterizado porque la etapa g) incluye retiro del desnaturalizante por diafiltración o diálisis.
29. El proceso según la reivindicación 28, caracterizado porque la diafiltración o diálisis es contra una solución de pH 7-9.
30. El proceso según cualquier reivindicación precedente, comprendiendo además una etapa adicional de destoxificar la citolisina bacteriana por tratamiento químico.
31. El proceso según la reivindicación 30, caracterizado porque el tratamiento químico incluye uso de un agente de degradación.
32. El proceso según la reivindicación 31, caracterizado porque el reactivo de degradación contiene uno o más químicos seleccionados del grupo que consiste de: formaldehído, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimido y GMBS.

HOJA ENMENDADA

33. El proceso según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque comprende una etapa adicional de conjugar la citolisina bacteriana con un polisacárido capsular bacteriano.
34. El proceso según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque comprende una etapa adicional de formular citolisina bacteriana en una composición de vacuna con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
35. El proceso según la reivindicación 34, caracterizado porque la citolisina bacteriana se formula con proteína de unión de colina A o un fragmento inmunogénico de la misma.
36. El proceso según la reivindicación 34 o 35, caracterizado porque la citolisina bacteriana se formula con uno o más de PhtA, PhtB, PhtD o PhtE o un fragmento inmunogénico de los mismos.
37. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 34-36, caracterizado porque la citolisina bacteriana se formula con un antígeno de *Haemophilus Influenzae* sin tipo (NtHI).
38. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 34-37, caracterizado porque la citolisina bacteriana se formula con un antígeno de *Moraxella catarrhalis*.
39. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 34-38, caracterizado porque la citolisina bacteriana se formula con un antígeno de RSV.
40. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 34-39, caracterizado porque la citolisina bacteriana se formula con un antígeno de virus de parainfluenza.
41. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 34-40, caracterizado porque la citolisina bacteriana se formula con un antígeno de virus de Influenza.
42. Un proceso para destoxificación de una toxina bacteriana comprendiendo tratar una toxina con un compuesto químico que es reactivo con grupos amina primaria en donde arriba del 50% de la toxina mantiene un peso molecular dentro del 20% de su peso molecular original después de tratamiento, como se valora por SDS-PAGE.

HOJA ENMENDADA

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference CLJ/VB60139		FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA/16
International application No. PCT/EP2004/002641		International filing date (day/month/year) 11.03.2004	Priority date (day/month/year) 13.03.2003	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K14/315, C12P21/00, A61K39/09, C07K1/20				
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. et al.				
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of 4 sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (Indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 602 of the Administrative Instructions).				
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☒ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application				
Date of submission of the demand 02.12.2004		Date of completion of this report 10.06.2005		
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tlx 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016		Authorized Officer Schneider, P Telephone No. +31 70 340-4523 		

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the International application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-36 as originally filed

Claims, Numbers

1-42 received on 02.12.2004 with letter of 01.12.2004

Drawings, Sheets

1/5-5/5 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing
3. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☒ the claims, Nos. 43-54
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify)*:
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify)*:
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

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

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 42

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

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

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

☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 42

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation to restrict or pay additional fees, the applicant has:
- ☐ restricted the claims.
 - ☐ paid additional fees.
 - ☐ paid additional fees under protest.
 - ☒ neither restricted nor paid additional fees.
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with.
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-41 .

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-41
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-41
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-41,
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet .

Re Item IV

Lack of unity of invention

This Authority considers that there are 2 inventions covered by the claims as indicated on Form PCT/ISA/206.

For the reasons for which the inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, as required by Rule 13.1 PCT, see also Form PCT/ISA/206.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D1: MITCHELL T J ET AL.; : BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1007, no. 1, 1989, pages 67-72
- D2: QUEIROZ J A ET AL.; JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 87, no. 2, 4 May 2001 (2001-05-04), pages 143-159
- D3: WO 96/05859 A (AMERICAN CYANAMID CO) 29 February 1996 (1996-02-29)
- D4: Roettger et al.; Biotechnology Progress, 1989, vol. 5, no. 3, pages 79-88

1 Amendments (Art. 28 PCT)

A new set of claims has been filed with a letter dated 01.12.2004, received 02.12.2004. These amendments have a basis in the application as filed and is therefore considered allowable under Art. 28(2) PCT.

2 Novelty (Art. 33(2) PCT)

The present application discloses a process for purification of a bacterial cytolysin comprising i.a. the step of binding soluble aggregated cytolysin in the presence of a detergent to a hydrophobic interaction chromatography material under high salt conditions of 0.6 to 2M salt as the only chromatographic step of the procedure.

No such procedure has been disclosed for the purification of bacterial cytolysin. The established method used in the art is described in D1 and uses a low salt chromatography at 250mM and a second chromatographic step without detergent.

As a consequence, the subject matter of claims 1 to 41 is new under Art. 33(2) PCT.

3 Inventive Step (Art. 33(3) PCT)

3.1 Document D1 is the closest prior art to the subject matter of independent claim 1 and discloses the purification of pneumolysin polypeptides using hydrophobic interaction on Phenyl-Sepharose (p.68) from which the subject matter of claim 1 differs in that a higher salt concentration is used to bind pneumolysin to the chromatographic material and that a detergent is present.

The technical effect that is associated with said difference is that no second chromatographic step is performed to increase the pneumolysin concentration.

The problem to be solved by the present invention is the provision of a simplified chromatographic procedure to purify pneumolysin/cytolysin.

3.2 As cytolysin is of known immunogenic value there is a constant need in the art to optimize the purification procedure. The skilled person knows about the problem to be solved.

From the art, the skilled person also knows that in D1 a relatively low salt concentration (250mM) was used (see e.g. D4, p.87, Table 4, 0.5 to 1.3M) to bind pneumolysin. He would therefore consider to use a higher range of concentrations, e.g. the range of the present application. In doing so however, the skilled person would recognize the solubility problem of aggregation of the protein molecules as disclosed with the present application (see e.g. p.1). As this has serious negative impacts on the whole purification procedure, the skilled person would return to concentration where no aggregation occurs, i.e. to low salt concentration known in the art.

87
5A

3.3 In the present application these solubility problems were partly compensated by adding a detergent. As a consequence, aggregates remained small and soluble and the chromatographic step could be done under high salt conditions (1.0M NaCl). This lead to the surprising effect that only one purification step lead to the purification of the protein. Although it was known in the art that solubility problems can be solved by using detergents (D2, p.150), it was also known from the same passage of D2 that detergent are also used to strip chromatography columns, i.e. to elute all proteins bound, which is of course not desirable at the step of binding to the column material.

Taken together, it does not appear likely that the skilled person trying to solve the problem posed would try to work at high salt concentration with a detergent bearing in mind the risks and heaving no reasonable expectation of success in improving the method compared to the established method at low salt concentration.

Therefore, an inventive step under Art. 33(3) PCT is acknowledged.

4 Industrial Application (Art. 33(4) PCT)

The present claims fulfill the requirement of industrial applicability (Art. 33(4) PCT).

57

1. A process for purification of a bacterial cytolysin comprising the steps of:
 - a) growing a culture of cells expressing bacterial cytolysin;
 - b) preparing an extract from the culture containing bacterial cytolysin;
 - c) binding soluble aggregated bacterial cytolysin contained in the extract in the presence of detergent to a hydrophobic interaction chromatography material under high salt (preferably 0.6-2M salt) conditions;
 - d) eluting bacterial cytolysin in the presence of detergent under low salt (preferably 0-0.2M salt) conditions.
2. The process of claim 1 further comprising the steps of:
 - e) removing detergent from the bacterial cytolysin
 - f) solubilising the bacterial cytolysin by addition of a denaturant;
 - g) removing the denaturant from the bacterial cytolysin.
3. The process of claim 1 or 2 wherein the bacterial cytolysin is pneumococcal pneumolysin.
4. The process of claims 1-3 wherein step b) involves mechanically breaking the cells.
5. The process of claims 1-4 wherein step b) involves treatment with detergent.
6. The process of claims 1-5 wherein the same detergent is present in steps c) and d).
7. The process of claim 5 wherein the same detergent is present in steps b), c) and d).
8. The process of claims 1-7 wherein the detergent is present in a concentration of between 0.1 and 5% (w/v).
9. The process of any preceding claim wherein step b) involves centrifugation of disrupted cell material and collection of a supernatant as the extract of step c).

- ~~56~~
56
10. The process of any preceding claim wherein the hydrophobic interaction chromatography material used in step c) contains aromatic groups.
 11. The process of claim 10 wherein the hydrophobic chromatography material is phenyl-sepharose.
 12. The process of any preceding claim wherein the detergent present in the solution used in step c) and/or step d) is an aliphatic detergent.
 13. The process of any preceding claim wherein the detergent is sodium lauryl sarcosinate.
 14. The process of any preceding claim wherein the high salt conditions of step c) contains between 0.6M and 2M salt.
 15. The process of any preceding claim wherein the solution used in step c) and/or d) contains a salt selected from the group consisting of sodium chloride, magnesium chloride, ammonium chloride, sodium sulphate, magnesium sulphate, ammonium sulphate, sodium phosphate, magnesium phosphate, ammonium phosphate.
 16. The process of any preceding claim wherein the conditions used in step c) and/or step d) are between pH 6-8, preferably around pH 7.
 17. The process of any preceding claim wherein the conditions used in step d) contain 0 - 0.1M salt.
 18. The process of claim 17 wherein the conditions used in step d) contain 0-40mM salt.
 19. The process of any preceding claim wherein step e) involves the removal of detergent by diafiltration or dialysis.
 20. The process of claim 19 wherein the diafiltration/dialysis is against a low salt buffer of pH 8-10, preferably around pH 9.

AMENDED SHEET

21. The process of claims 2-20 wherein step f) involves denaturing the bacterial cytolysin by addition of a denaturant and step g) involves refolding the bacterial cytolysin by gradually removing the denaturant
22. The process of claims 2-21 wherein the denaturant used in step f) is guanidine hydrochloride.
23. The process of claim 22 wherein 5-8M guanidine hydrochloride is used.
24. The process of claims 22-24 wherein the bacterial cytolysin is contacted with 5-9M urea during step f).
25. The process of claim 24 wherein step f) involves contacting bacterial cytolysin with 5-8M guanidine hydrochloride followed by exchanging the guanidine hydrochloride for 5-9M urea.
26. The process of claims 21-25 wherein a reducing agent is present during at least part of steps f) and g).
27. The process of claim 26, wherein the reducing agent is 0.1-10mM DTT, preferably around 1mM DTT.
28. The process of claim 2-27 wherein step g) involves removal of the denaturant by diafiltration or dialysis.
29. The process of claim 28 wherein diafiltration or dialysis is against a solution of pH 7-9.
30. The process of any preceding claim comprising a further step of detoxifying the bacterial cytolysin by chemical treatment.
31. The process of claim 30 wherein the chemical treatment involves use of a crosslinking agent.
32. The process of claim 31 wherein the crosslinking reagent contains one or more chemicals selected from the group consisting of: formaldehyde, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimido esters and GMBS.

AMENDED SHEET

33. The process of any preceding claim comprising a further step of conjugating the bacterial cytolysin to a bacterial capsular polysaccharide.
34. The process of any preceding claim comprising a further step of formulating bacterial cytolysin into a vaccine composition with a pharmaceutically acceptable excipient.
35. The process of claim 34 wherein the bacterial cytolysin is formulated with choline binding protein A or an immunogenic fragment thereof.
36. The process of claim 34 or 35 wherein the bacterial cytolysin is formulated with one or more of PhtA, PhtB, PhtD or PhtE or an immunogenic fragment thereof.
37. The process of any one of claims 34-36 wherein the bacterial cytolysin is formulated with an antigen from non-typeable *Haemophilus influenzae* (NtHI).
38. The process of any one of claims 34-37 wherein the bacterial cytolysin is formulated with an antigen from *Moraxella catarrhalis*.
39. The process of any one of claims 34-38 wherein the bacterial cytolysin is formulated with an antigen from RSV.
40. The process of any one of claims 34-39 wherein the bacterial cytolysin is formulated with an antigen from parainfluenza virus.
41. The process of any one of claims 34-40 wherein the bacterial cytolysin is formulated with an antigen from influenza virus.
42. A process for detoxification of a bacterial toxin comprising treating a toxin with a chemical compound that is reactive with primary amine groups wherein over 50% of the toxin retains a molecular weight within 20% of its original molecular weight after treatment, as assessed by SDS-PAGE.

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Artículo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capítulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

PROCESOS DE PURIFICACIÓN PARA CITOLISINA BACTERIANA

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con un método para purificar citosinas bacterianas tal como neumolisina neumocócica. Un solo paso de cromatografía produce purificación excelente de la citolisina mediante el enlace de citolisina de agregado soluble a un material de cromatografía de interacción hidrofóbico en presencia de detergente y sal alta.

PROCESO DE PURIFICACIÓN PARA CITOLISINA BACTERIANA

Campo Técnico

La presente invención está relacionada con el campo de la purificación de citolisina bacteriana, y particularmente con un método de purificación de neumolisina. La pneumolisina es una proteína del *Streptococcus pneumoniae* con buenas propiedades antigénicas, que es un adecuado componente de vacuna contra infección *S. pneumoniae* u otitis media. El método de la invención describe un paso inusual y ventajoso de purificación de neumolisina en un paso cromatográfico simple enlazándolo a una columna de interacción hidrofóbica en presencia de detergente o sal alta. El proceso hace uso ventajosamente de la propiedad de las citolisinas bacterianas de tener alta afinidad por los compuestos aromáticos que se parecen al colesterol, particularmente en una condición agregada, y por lo tanto será generalmente aplicable para la purificación de miembros de esta familia de toxinas.

Las citosinas activadas por tiol forman un grupo prominente de toxinas bacterianas de las cuales la esteptolisina O es el prototipo (Billington et al FEMS Microbiol. Lett. (2000), 182; 197-205). Estas toxinas son líticas para células eucarióticas, mediante la formación de poros en la membrana de la célula. Los agentes oxidantes afectan adversamente su actividad citolítica, mientras que los agentes reductores pueden restaurar la actividad. Los miembros de este grupo muestran 30-60% de similitud en la secuencia de amino ácido primaria, y contienen una secuencia undecapéptido casi invariante cerca del terminal C. El colesterol es el mayor receptor de célula objetivo para estas toxinas. Las citolisinas se enlazan al colesterol que contiene membranas y se oligomeriza para formar poros de transmembrana de hasta 30 nm de diámetro, y compuestos de 40-80 sub-unidades de monómeros. El enlace del colesterol de membrana induce un cambio conformacional en el monómero de toxina que dirige los eventos posteriores de oligomerización, inserción de membrana y formación de poro.

El *Streptococcus pneumoniae* es el agente causante de varias enfermedades humanas incluyendo neumonía, bacteremia, meningitis, otitis media y sinusitis. Algunas veces estas enfermedades pueden conducir a

PROCESO DE PURIFICACIÓN PARA CITOLISINA BACTERIANA

Campo Técnico

La presente invención está relacionada con el campo de la purificación de citolisina bacteriana, y particularmente con un método de purificación de neumolisina. La neumolisina es una proteína del *Streptococcus pneumoniae* con buenas propiedades antigénicas, que es un adecuado componente de vacuna contra infección *S. pneumoniae* u otitis media. El método de la invención describe un paso inusual y ventajoso de purificación de neumolisina en un paso cromatográfico simple enlazándolo a una columna de interacción hidrofóbica en presencia de detergente o sal alta. El proceso hace uso ventajosamente de la propiedad de las citolisinas bacterianas de tener alta afinidad por los compuestos aromáticos que se parecen al colesterol, particularmente en una condición agregada, y por lo tanto será generalmente aplicable para la purificación de miembros de esta familia de toxinas.

Las citolisinas activadas por Ca^{2+} forman un grupo prominente de toxinas bacterianas de las cuales la estreptolisina O es el prototipo (Billington et al FEMS Microbiol. Lett. (2000), 182; 197-205). Estas toxinas son líticas para células eucarióticas, mediante la formación de poros en la membrana de la célula. Los agentes oxidantes afectan adversamente su actividad citolítica, mientras que los agentes reductores pueden restaurar la actividad. Los miembros de este grupo muestran 30-60% de similitud en la secuencia de amino ácido primaria, y contienen una secuencia undecapéptido casi invariante cerca del terminal C. El colesterol es el mayor receptor de célula objetivo para estas toxinas. Las citolisinas se enlazan al colesterol que contiene membranas y se oligomeriza para formar poros de transmembrana de hasta 30 nm de diámetro, y compuestos de 40-80 sub-unidades de monómeros. El enlace del colesterol de membrana induce un cambio conformacional en el monómero de toxina que dirige los eventos posteriores de oligomerización, inserción de membrana y formación de poro.

El *Streptococcus pneumoniae* es el agente causante de varias enfermedades humanas incluyendo neumonía, bacteremia, meningitis, otitis media y sinusitis. Algunas veces estas enfermedades pueden conducir a

62

fatalidades a pesar de la disponibilidad de antibióticos. La aparición de cepas resistentes a antibióticos de *S. pneumoniae* ha agravado los problemas causados por este patógeno. En este contexto, es importante que se desarrollen vacunas efectivas contra *S. pneumoniae*.

Las vacunas neumocócicas que contienen polisacáridos capsulares purificados han estado disponibles por varios años. Su aplicación está limitada por la pobre inmunogenicidad, particularmente en grupos de alto riesgo incluyendo niños, ancianos y aquellos con anemia drepanocítica, mieloma múltiple, cirrosis o alcoholismo. También proveen protección específica de serotipo y solamente 23 por fuera de los 80 serotipos conocidos están cubiertos por las formulaciones existentes. Esto dará protección contra el 90% de los serotipos encontrados en la población Americana, pero contra solamente el 70% de los serotipos encontrados en las poblaciones Asiáticas. Recientemente, una vacuna conjugada alete-valente se ha vuelto disponible, que igualmente tiene problemas de protección contra todas las cepas neumocócicas.

La Pneumolaina (Ply) es una citolaina activada por tóxi de 53kDa encontrada en todas las cepas de *S. pneumoniae*, que es liberada a la autólisis, y contribuye a la patogénesis de *S. pneumoniae*. Se conserva altamente con solamente unas pocas sustituciones de amino ácido que ocurren entre las proteínas Ply de diferentes serotipos. El alto grado de conservación de la pneumolaina y su inmunogenicidad la hace un candidato potencial como un componente de vacuna. Sin embargo, la Ply tipo nativa no es adecuada para la incorporación en vacunas para uso en humanos por su toxicidad. La Ply causa daño a las membranas de célula por la interacción con el colesterol enlazado a la membrana, y se oligomeriza para formar poros en la membrana. Un motivo conservado que contiene cisteína, encontrado cerca al terminal C ha estado implicado en la actividad lítica. Se ha sugerido que las mutaciones de Ply disminuyen esta toxicidad (W090/08851, W089/03884).

Se ha descrito un método de dos pasos para la purificación de pneumolaina por Lock et al (Microbial Pathogenesis (1996) 21; 71-83). La pneumolaina es purificada a partir de un cultivo de *E. coli* usando una combinación de intercambio iónico y cromatografía de filtración de gel. El método incluye los

pasos de preparar un extracto y pasarlo a través de una columna DEAE-Sefarosa seguido de una columna Sephacryl S200-HR. Este método podría usarse para purificar la neumolisina recombinante o nativa.

Kuo et al describe un método para purificar la proteína de fusión GST-neumolisina recombinante (Infection and Immunity (1995) 62; 2706-2713). La proteína de fusión está expresada en un cultivo de E. coli, y un lisado de célula es cargado en un gel de glutatona agarosa. La proteína de fusión es eluida con glutatona, y se puede usar trombina para clivar la proteína de fusión. Las proteínas fueron pasadas sobre una columna de glutatona-agarosa de nuevo para remover la GST. La neumolisina purificada de afinidad fue purificada adicionalmente usando una columna de hidroxilapatita.

Mitchell et al (BBA (1989) 1007:67-72) describe un método para purificar la neumolisina usando cromatografía de interacción hidrofóbica. Bajo las condiciones que ellos usan (sal 250 mM), la neumolisina falló en enlazarse ajustadamente a la columna aunque su progreso se retardó y la neumolisina se eluyó como un pico ancho. Se necesitaron pasos adicionales para determinar qué fracciones contenían neumolisina pura, concentrar las fracciones positivas, recargar en la columna y eluir con un pequeño volumen de agua, para superar el problema de no enlace ajustado de la neumolisina al material de la columna.

Permanece una necesidad continua de vacunas mejoradas contra S. pneumoniae. La incorporación de un componente Ply promete, aunque la toxicidad de la proteína permanece siendo un problema. También se requiere el desarrollo de un procedimiento rápido y efectivo para la purificación en masa de neumolisina. Los métodos descritos anteriormente involucran el uso de pasos de purificación múltiples con la intervención de pasos de ensayo y concentración. La presente invención provee un método de purificación más eficiente que usa ventajosamente un paso de cromatografía simple, que es capaz de ser usado para purificar grandes lotes de neumolisina.

Descripción de las figuras

Figura 1 – geles de SDS-PAGE que muestran la purificación de neumolisina. Las siguientes muestras fueron corridas sobre geles de SDS-PAGE: línea 1 – estándares de peso molecular, línea 2 – sobrenadante de extracto de célula, línea 3 – flujo a través de fenil-sefaroasa, línea 4 – primer lavado de fenil sefaroasa, línea 5 – segundo lavado de fenil sefaroasa, línea 6 – lavado de fenil sefaroasa con NaCl 0.5M, línea 7 – elusión de fenil sefaroasa con amortiguador de sal baja, línea 8 – neumolisina después de los pasos de desnaturalización/repliegue, línea 9 – neumolisina después de la filtración de esterilización.

El Panel A muestra el gel después del coloreado con azul Coomassie. El panel B muestra el gel después de un procedimiento de manchado Western usando anticuerpos anti- E.coli para prueba de las proteínas contaminantes.

Figura 2 – análisis SDS-PAGE de neumolisina modificada con GMBS (N-(γ-maleimidobutirilo) succinimida éster) – coloreada con azul Coomassie.

Las siguientes muestras fueron corridas sobre un gel de SDS-PAGE: línea 1 – estándares de peso molecular, línea 2 – neumolisina no modificada, línea 3 – PLY tratada con GMBS a una relación molar de GMBS/lisina de 4/1, línea 4 – PLY tratada con GMBS a una relación molar de GMBS/lisina de 4/1, e incubada por 7 días a 37°C, línea 5 – PLY tratada con GMBS a una relación molar de GMBS/lisina de 8/1, línea 6 – PLY tratada con GMBS a una relación molar de GMBS/lisina de 8/1 después de incubación por 7 días a 37°C, línea 7 – PLY tratada con acetato de sulfato-NHS a una relación molar de NHS/lisina de 10/1, línea 8 – PLY tratada con NEM, línea 9 – PLY tratada con NEM después de 7 días de incubación a 37°C.

Figura 3 – Toxicidad de neumolisina tratada con GMBS administrada intranasalmente a ratones. El línea marcada con diamantes indica la tasa de supervivencia para los ratones sometidos con 2 ug de neumolisina nativa. La línea marcada con cuadrados indica la tasa de supervivencia para ratones sometidos con 10 ug de neumolisina tratada con GMBS.

Figura 4 – Protección inducida por neumolisina tratada con GMBS en ratones sometidos intranasalmente con neumolisina nativa. La línea marcada con rectángulos muestra la rata de supervivencia en ratones inoculados con adyuvante solo. La línea marcada con diamantes indica la rata de supervivencia para ratones inoculados con neumolisina nativa. La línea marcada con cuadrados indica la rata de supervivencia para ratones inoculados con neumolisina tratada con GMBS.

Figura 5 – Protección inducida mediante inoculación con PhtD y neumolisina tratada con GMBS en ratones sometidos intranasalmente con cepa neumocócica D39 tipo 2. La línea marcada con rectángulos representa la rata de supervivencia para ratones inoculados con adyuvante solo. La línea marcada con diamantes representa la rata de supervivencia para ratones inoculados con PhtD. La línea marcada con cuadrados representa la rata de supervivencia para ratones inoculados con PhtD y neumolisina tratada con GMBS.

Descripción detallada

Proceso

El proceso de la invención es un método para purificar una citosina bacteriana tal como neumolisina. Una citosina, por ejemplo neumolisina, es purificada usando solamente un paso de cromatografía de columna sin requerir la recarga en la columna. La proteína es enlazada en una forma agregada a una columna de interacción hidrofóbica en presencia de un detergente y una sal. Pocas proteínas se enlazan a la columna bajo estas condiciones permitiendo la purificación de una citosina en un solo paso.

Para los propósitos de la invención, un agregado soluble de una citosina, preferiblemente una neumolisina, es una forma de agregado de la citosina que permanece en el sobrenadante después de la centrifugación a 30,000 g por 20 minutos. El agregado soluble es retenido sobre un material de cromatografía de interacción hidrofóbica, preferiblemente fenil-Sofarosa, en presencia de una sal alta, preferiblemente 1M. Opcionalmente, el agregado soluble es coloidal.

La citolaina, preferiblemente neumolaina, se enlaza a la columna como un agregado soluble. Es usual cargar agregados en una columna por varias razones que incluyen filtros o columnas que se obstruyen, y pérdida de material. Sin embargo, usando un detergente que reduce el tamaño de los agregados para formar un agregado soluble. Se encuentra que estos agregados se enlazan ajustadamente a la columna bajo condiciones de detergente, pero pueden ser eluidos a una pureza de al menos 60%, 60%, 70%, 80%, preferiblemente 90%, 95%, más preferiblemente 97%, 98% o 99% según se evalúa mediante el análisis de SDS-PAGE sin afectar adversamente los filtros de columna. El proceso produce preferiblemente un rendimiento de al menos 100, 200, 500, 700, más preferiblemente 1000, 1500, 1700 o 1900 mg de citolaina, preferiblemente neumolaina por litro de fermentación. Preferiblemente, al menos 1%, 2%, 5%, 7%, 9% o 10% de la proteína del cultivo de fermentación es recuperado como citolaina purificada, preferiblemente neumolaina.

El proceso explota la habilidad de las citolinas, tal como neumolaina, para enlazarse al colesterol y otros compuestos aromáticos. Este enlace es particularmente ajustado cuando la citolaina es agregada, permitiendo a la citolaina enlazarse en presencia de detergente. El proceso puede extenderse a otros miembros de la familia de citolaina porque todos los miembros comparten la habilidad de enlazarse a compuestos aromáticos y formar poros. De hecho, el método se podría usar para purificar otras familias de proteína que se enlazan al colesterol u otros compuestos aromáticos y/o formar poros, preferiblemente ambos.

En consecuencia, en una primera realización, se provee un proceso para purificación de citolaina bacteriana, que comprende los pasos de:

- a) cultivar un cultivo de células que expresan citolaina bacteriana;
- b) preparar un extracto a partir del cultivo que contiene citolaina bacteriana;
- c) enlazar la citolaina bacteriana de agregado soluble contenida en el extracto, en presencia de detergente (preferiblemente detergente alifático) a un material de cromatografía de interacción hidrofóbico, bajo condiciones de sal alta (preferiblemente sal 0.5-2 M);

- 53
- d) eluir la citolisina bacteriana en presencia de detergente (preferiblemente detergente alifático) bajo condiciones de sal baja (preferiblemente sal 0-0.2M).

En una segunda realización, se provee un proceso para un proceso para purificación de citolisina bacteriana, que comprende los pasos de:

- a) cultivar un cultivo de células que expresan citolisina bacteriana;
- b) preparar un extracto a partir del cultivo que contiene citolisina bacteriana;
- c) enlazar la citolisina bacteriana contenida en el extracto, a un material de cromatografía de interacción hidrofóbica en presencia de una solución que contiene sal 0.5-2 M y detergente al 0.1%-5%;
- d) eluir la citolisina bacteriana usando una solución baja en sal (preferiblemente sal 0-0.2M) que contiene 0.1-5% de detergente.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el proceso de la invención comprende preferiblemente los pasos adicionales de:

- e) remover el detergente de la citolisina bacteriana
- f) solubilizar la citolisina bacteriana mediante la adición de un desnaturalizante.
- g) remover el desnaturalizante de la citolisina bacteriana.

El proceso de la invención se puede usar ventajosamente para purificar neumolisina neumocócica. Otras citolisinas que se pueden purificar mediante el método de la invención incluyen plolisina de *A. pyogenes*, cereolisina de *B. cereus*, turingiolisina O de *B. thuringiensis*, lateroseporolisina de *B. laterosporus*, bifementolisina de *C. bifementans*, botuquinolisina de *C. botulinum*, cheuvolisina de *C. chevroi*, histoliticolisina de *C. histolyticum*, edematolisina de *C. novyi* tipo A, perfringolisina O de *C. perfringens*, septicolisina O de *C. septicum*, sordellisina de *C. sordellii*, letanolisina de *C. tetani*, ivanolisina O de *L. ivanovi*, listeriolisina O de *L. monocytogenes*, saaligerilisina O de *L. saaligeri*, alveolisina de *P. Alvei*, estreptolisina O de *S. pyogenes*, *S. canis* o *S. equisimilis*, intermediolisina de *S. intermedius*, aulisina de *S. suis*

neumolisina de *S. pneumoniae*, que puede ser de tipo nativa o puede ser una toxina modificada genéticamente con niveles más bajos de toxicidad tal como PdA y PdB descrita anteriormente.

Por neumolisina o Ply se quiere decir: neumolisina nativa a partir de neumococo o neumolisina recombinante, neumolisina tipo nativa o mutantes de neumolisina (e.g., aquellas descritas en WO 90/06951 y WO99/03884). Opcionalmente, la neumolisina puede también significar cualquier fragmento de neumolisina o cualquier variante de neumolisina que comparte al menos 70, 80, 90 o 95% de identidad de secuencia de amino ácido con una secuencia de neumolisina de tipo nativa, que aún retiene la habilidad de ser purificada mediante los métodos de la invención, como lo puede determinar fácilmente una persona experta.

En realizaciones preferidas de la invención, el mismo detergente está presente en los pasos b) y c), b) y d), c) y d), más preferiblemente en los pasos b), c) y d), preferiblemente a una concentración del 0.1%-5% (p/v). Para los propósitos de la invención, un detergente alifático se define como un detergente substancialmente alifático con insuficiente carácter aromático para evitar el enlace de la citolisina a la columna en el paso c). Preferiblemente, el detergente tendrá uno o menos anillos aromáticos, más preferiblemente no tiene anillos aromáticos. Durante el paso b), es ventajoso para el detergente romper agregados más grandes de citolisina en agregados más pequeños que hacen un agregado soluble. Durante los pasos c) y d), el detergente retiene ventajosamente el ~~estado~~ agregado soluble de la citolisina, permitiéndole enlazarse a la columna en condiciones de sal altas con alta afinidad.

La citolisina, preferiblemente neumolisina, está expresada en un cultivo de células bacterianas, preferiblemente *S. pneumoniae*, *E. coli* o alternativamente en células de levadura, células de insecto, células mamíferas o cualquier otro sistema de expresión adecuado para su expresión. En los sistemas de expresión que producen altos rendimientos de neumolisina, la neumolisina usualmente se vuelve agregado por sí sola, y el proceso de la invención es ideal para su purificación. Preferiblemente, la neumolisina está expresada a altos rendimientos de forma que hace más del 2, 3, 4, 5, 7 o 10% de la proteína total en el sistema de expresión.

Preferiblemente, la neumolisina está en una forma agregada y por lo tanto, principalmente libre de actividad hemolítica. Por ejemplo, la expresión en E.coli en un fermentador bajo un promotor y de fago u otros promotores que permiten la expresión alta, son bien conocidos por el experto en la técnica.

Preferiblemente, la citolisina es extraída del sistema de expresión como un agregado. Alternativamente, un sistema de expresión de rendimiento más bajo puede proveer citolisina soluble. En este caso, el extracto que contiene citolisina, preferiblemente neumolisina, es ajustado hasta un pH por debajo de 7.5, que permite a la citolisina agregarse por un período de al menos 8 horas, preferiblemente, al menos 24 horas.

La preparación de un extracto en el paso b) involucra preferiblemente uno más pasos de rompimiento mecánico de las células y/o tratamiento de las células con detergente. Si se hace con un método de alto rendimiento, la neumolisina permanece en la forma de agregados, pero los agregados deben ser suficientemente pequeños para que permanezcan en el sobrenadante después de la centrifugación de la muestra bajo las condiciones necesarias para paletizar el desecho celular insoluble. Preferiblemente, el detergente usando en la invención es un detergente anfipático que no contiene anillos aromáticos, preferiblemente un detergente iónico, más preferiblemente un detergente catiónico o aniónico, y lo más preferido, el detergente es lauroil sarcosinato de sodio. Los detergentes preferidos son capaces de solubilizar la neumolisina mientras la dejan en forma de pequeños agregados que se enlazan a la columna de interacción hidrofóbica sin causar bloqueo de los filtros unidos a la columna. Los detergentes preferidos son capaces de reducir el tamaño de los agregados de neumolisina, permitiendo a los agregados de neumolisina ser suficientemente pequeños para que permanezcan en el sobrenadante después de la centrifugación de la muestra a 30,000 g por 20 minutos. Tales agregados solubles son purificables como tales sobre la columna de interacción hidrofóbica. El detergente está presente a una concentración entre 0.1% y 5%, preferiblemente 0.5% y 3% (p/v), preferiblemente entre 0.75% y 2%, más preferiblemente aproximadamente 1%. Preferiblemente, el detergente es dializable.

10

Si guiendo el deterloro mecánico y/o de detergente del cultivo en el paso b), el proceso de la invención incluye centrifugación del material de célula y recolección del sobrenadante como el extracto a ser cargado en el material de cromatografía durante el paso c). La neumolaina está presente preferiblemente en el sobrenadante como un agregado soluble.

El proceso de la invención usa cromatografía de Interacción hidrofóbica para purificar la neumolaina en un solo paso. El material de columna usado en el paso c) contiene preferiblemente grupos aromáticos, preferiblemente grupos fenilo, y más preferiblemente es fenil-safarosa.

La solución usada en el paso c) y/o paso d), durante la carga y elusión de la columna comprende un detergente iónico, preferiblemente un detergente catiónico o aniónico, preferiblemente un detergente que es soluble a concentraciones de sal por encima de 0.5 M, más preferiblemente, el detergente es lauril sarcosinato de sodio. El detergente usado es uno que reduce el tamaño de la citosina, preferiblemente neumolaina, agregados, que permite a la citosina estar presente en la muestra como un agregado soluble de forma que se enlace al material de columna de interacción hidrofóbica sin estar irreversiblemente pegada sobre la columna. El detergente está presente a una concentración preferiblemente entre 0.1% y 5%, preferiblemente 0.5% y 3% (p/v), más preferiblemente entre 0.75% y 2%, la más preferido, aproximadamente 1%.

La solución usada en el paso c) y/o d) contiene una sal, preferiblemente una sal seleccionada del grupo consistente de cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, fosfato de amonio, y está preferiblemente amortiguada a pH 6-8, preferiblemente alrededor de pH 7. Se puede usar cualquier amortiguador capaz de mantener el pH entre pH 5 y 9.

La solución usada para enlazar la neumolaina a la columna en el proceso de la invención, contiene una alta concentración de sal, preferiblemente 0.5-2 M, más preferiblemente aproximadamente 1M. La concentración de sal es elegida de forma que la neumolaina esté en forma de un agregado soluble, y sea capaz de enlazarse al material de cromatografía hidrofóbica.

13

Opcionalmente, el paso c) puede contener un paso extra de lavado de la columna en condiciones de sal intermedia de aproximadamente sal 0.5M o una concentración de sal capaz de remover cualquier impureza enlazada pobremente.

El proceso de la invención usa un gradiente de sal descendente para eluir la neumolisina de la columna. Preferiblemente, la solución baja en sal usada para hacer el gradiente de sal en el paso d) contiene sal entre 0-0.1 M, más preferiblemente sal 0-40 mM. Alternativamente, la elución por pasos se puede usar con el amortiguador bajo en sal usado en el paso d), que contiene sal entre 0-0.2M, más preferiblemente sal 0-40 mM.

Se puede agregar pasos opcionales al proceso de la invención si se prefiere, para desnaturar la neumolisina y posteriormente replegarla mediante la remoción del desnaturizante. Estos pasos opcionales aseguran que se obtenga la citolisina pura, preferiblemente neumolisina, con una estructura nativa. El primer paso opcional e) involucra la remoción del detergente mediante diafiltración, diálisis o dilución. Este paso involucra preferiblemente diafiltración/diálisis contra un amortiguador de pH 8-10, preferiblemente cerca de 9, más preferiblemente el amortiguador es uno capaz de amortiguara valores de pH alcalinos, más preferiblemente el amortiguador es DEA. La solución es preferiblemente de resistencia iónica baja, preferiblemente 10-50 mM, más preferiblemente cerca de 25 mM. La diafiltración o diálisis se realiza preferiblemente a 4°C pero se realiza alternativamente a temperatura ambiente.

En un segundo paso opcional, la citolisina, preferiblemente neumolisina es desnaturizada y solubilizada mediante la adición de un desnaturizante. Preferiblemente, el desnaturizante usado en el paso f) es clorhidrato de guanidina, más preferiblemente clorhidrato de guanidina 5-8 M, más preferiblemente clorhidrato de guanidina de cerca de 6M. La neumolisina es incubada con clorhidrato de guanidina por al menos 10 minutos, preferiblemente por al menos 1 hora, más preferiblemente por aproximadamente una hora.

La citolisina, preferiblemente neumolisina, es preferiblemente luego concentrada con urea 5-9 M, preferiblemente urea aproximadamente 8 M durante el paso f). Esto se logra mediante diafiltración o diálisis de la citolisina, preferiblemente neumolisina contra urea. Preferiblemente, se mantienen el mismo pH y amortiguador durante el intercambio del deenaturalizante. Preferiblemente, se agrega un agente reductor (DTT, 2-mercaptoetanol o glutatona durante el intercambio del deenaturalizante.

Preferiblemente, el paso f) implica contactar la citolisina, preferiblemente neumolisina con clorhidrato de guanidina 5-8 M seguido del intercambio del clorhidrato de guanidina por urea 5-9 M.

Con el fin de evitar la formación de enlaces de disulfuro inapropiados mientras la citolisina, preferiblemente neumolisina es deenaturalizada, se asegura ventajosamente que un agente reductor esté presente durante al menos parte de los pasos f) y g). Un agente reductor preferido es DTT 0.1-10 mM, preferiblemente DTT alrededor de 1 mM. Alternativamente se usa glutatona o 2-mercaptoetanol. La concentración preferida de glutatona es 1-50 mM, más preferiblemente 10-30 mM.

El paso g) opcional implica la remoción del deenaturalizante con el fin de replegar la citolisina, preferiblemente neumolisina, preferiblemente mediante diafiltración o diálisis contra un amortiguador bajo en sal de pH 6-11, preferiblemente aproximadamente pH 9. Preferiblemente, la concentración de citolisina, preferiblemente neumolisina se mantiene a al menos 100 ug/ml, preferiblemente entre 100 ug/ml y 1000 ug/ml, más preferiblemente a aproximadamente 500 ug/ml. Opcionalmente, la diafiltración o diálisis es contra un amortiguador que contiene propilén glicol entre el 10 y 30%, preferiblemente aproximadamente 15%. Preferiblemente, se mantiene un agente reductor como se describió anteriormente durante el paso g). La diafiltración o diálisis se realiza preferiblemente a 4°C pero se realiza alternativamente a temperatura ambiente.

Un paso opcional adicional h) involucra la remoción del agente reductor después que la citolisina, preferiblemente neumolisina se ha replegado. Esto se logra preferiblemente mediante diafiltración o diálisis contra un amortiguador bajo en sal de pH 6-11, preferiblemente alrededor de pH 9.

Opcionalmente, la diafiltración o diálisis es contra un amortiguador que contiene propilenglicol entre el 10 y 30%, preferiblemente aproximadamente 15%. La diafiltración o diálisis se realiza preferiblemente a 4°C pero se realiza alternativamente a temperatura ambiente.

En métodos preferidos de la de la invención, la citolisis, preferiblemente neumolisis es replegada de forma que su actividad hemolítica es restaurada hasta por encima del 25%, 60%, 75%, más preferiblemente por encima del 90% de aquella de la proteína plegada apropiadamente. Para los propósitos de la invención, proteína "plegada" es una proteína que tiene la estructura terciaria de la proteína hecha mediante un proceso no desnaturizante. En el caso de neumolisis tipo nativa, la actividad hemolítica esperada de neumolisis replegada sería de 500,000 – 1,000,000 unidades hemolíticas/mg de neumolisis. En el caso de neumolisis mutada de punto con una actividad hemolítica más baja, la actividad hemolítica de la neumolisis replegada sería correspondientemente menor.

Destoxificación de una toxina

La citolisis purificada mediante el método de la invención, preferiblemente neumolisis, puede ser sometida a un paso opcional adicional de destoxificación mediante tratamiento químico. Este paso adicional es particularmente ventajoso si la citolisis, preferiblemente neumolisis, será administrada a un animal o un humano. La neumolisis es altamente tóxica. Varias proteínas de neumolisis mutadas que tienen toxicidad reducida han sido aisladas, aún estas retienen toxicidad residual que puede ser problemática cuando la neumolisis es administrada internamente (WO96/03884, WO90/06951). Alternativamente, puede ser destoxificada mediante conjugación a polisacáridos (WO96/05859).

El proceso de la invención puede destoxificar la citolisis tipo nativa o mutada, por ejemplo, la neumolisis mediante tratamiento químico. Realizaciones preferidas usan un agente de reticulación, más preferiblemente que contienen uno o más químicos seleccionados del grupo consistente de formaldehído, glutaraldehído y un reactivo de reticulación que contiene un N-hidroxiaucoclimido éster y/o un grupo maleimida (e.g., GMBB).

Los procesos de destoxificación en sí son un aspecto de la invención, y se pueden usar para destoxificar toxinas bacterianas, preferiblemente neumolisina, preparada mediante otros métodos.

En una realización, el método de destoxificación de la invención describe la destoxificación de una toxina bacteriana que comprende el tratamiento de la toxina con un compuesto químico, preferiblemente un reactivo de reticulación que es un reactivo, preferiblemente preferencialmente reactivo, más preferiblemente reactivo específicamente con grupos amina, más preferiblemente grupos de amina primaria.

Para los propósitos de esta solicitud, un reactivo de reticulación se define como un compuesto con al menos dos grupos reactivos, al menos uno de los cuales es capaz de reaccionar con al menos un grupo en la toxina bacteriana. Un grupo reactivo adicional es capaz de reaccionar con un grupo en la toxina bacteriana o un compuesto separado (por ejemplo, un amino ácido, péptido, polipéptido, azúcar o polisacárido).

Preferiblemente, el compuesto químico o el reactivo de reticulación es reactivo, preferiblemente preferencialmente reactivo, más preferiblemente específicamente reactivo con grupos amina y sulfhidrilo. Preferiblemente, el compuesto químico reacciona con un grupo de amina primaria de lisina, más preferiblemente, el reactivo de reticulación reacciona con un grupo de amina primaria de lisina y el grupo sulfhidrilo de cisteína. Este método es particularmente ventajoso cuando la neumolisina es destoxificada porque la modificación de los residuos de cisteína y lisina conduce a una disminución sinérgica en el nivel de hemólisis comparada con la actividad de hemólisis residual cuando el reactivo de reticulación reacciona con solamente lisina o cisteína.

Así, una realización alternativa provee un método para destoxificar toxinas bacterianas que comprende la modificación de un residuo de cisteína (opcionalmente cerca del terminal C de la toxina) involucrada en la actividad tóxica de la toxina (preferiblemente la actividad lítica), que comprende el tratamiento de la toxina con un reactivo de reticulación (preferiblemente un reactivo de reticulación heterobifuncional) que reticula los grupos sulfhidrilo con otro amino ácido de la toxina, preferiblemente más de 2, 5, 10, 15, 20,

30, 40 amino ácidos lejos de la cisteína en la estructura primaria. Preferiblemente, el otro amino ácido contiene un grupo de amina primaria y, más preferiblemente, el amino es lisina.

En algunas realizaciones, más del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de la toxina retiene un peso molecular entre 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, más preferiblemente entre 1-50%, lo más preferido entre 5-10% de el peso molecular original después del tratamiento según se evalúa mediante SDS-PAGE. Preferiblemente, la toxina adquiere un peso molecular ligeramente mayor siguiendo el tratamiento de destoxificación debido a los varios residuos de amino ácido que se modifican por enlaces covalente al compuesto químico. Sin embargo, el método de la invención preferiblemente no involucra la conjugación extensiva de la toxina, ya sea por enlace covalente de esta a otras moléculas de toxina de forma que se forme una toxina con una estructura customaria, o por enlace covalente de la toxina a otras proteínas grandes, polisacáridos o lipopolisacáridos. Más preferiblemente, los métodos, proteínas o productos revelados en WO95/05859 no están cubiertos por esta invención.

Los métodos de la invención se pueden usar para destoxificar las toxinas bacterianas. Las toxinas preferidas incluyen las citolisinas plolisina activadas por tior de *A. pyogenes*, cereolisina de *B. cereus*, turingiolisina O de *B. thuringiensis*, laterosporolisina de *B. laterosporus*, bifementolisina de *C. bifementans*, botuquinolisina de *C. botulinum*, chauveolisina de *C. chauvoei*, histoliticolisina de *C. histolyticum*, edematolisina de *C. novyi* tipo A, perfringolisina O de *C. perfringens*, septicolisina O de *C. septicum*, sordellisina de *C. sordelli*, tetanolisina de *C. tetani*, ivanolisina O de *L. ivanovi*, lateriolisina O de *L. monocytogenes*, seeligerilisina O de *L. seeligeri*, alveolisina de *P. Alvei*, estreptolisina O de *S. pyogenes*, *S. canis* o *S. equinus*, intermediolisina de *S. intermedius*, sullisina de *S. suis* o neumolisina de *S. pneumoniae*, que puede ser de tipo nativa o puede ser una toxina modificada genéticamente con niveles más bajos de toxicidad tal como PdA y PdB descritas anteriormente (WO90/08951, WO99/03884).

El método puede también ser usado para destoxificar las toxinas Neisseriales FrpA, FrpC (WO92/01460), FrpB (Microbiology 142; 3269-3274, (1998); J. Bacteriol. 181; 2895-2901 (1999)) NM-ADPRT (13th International

Pathogenic *Neisseria* Conference 2002 Mavigani et al p135). FrpA y FrpC contienen una región que está conservada entre estas dos proteínas y un fragmento preferido de las toxinas sería un polipéptido que contiene este fragmento conservado, que comprende preferiblemente los amino ácidos 227-1004 de la secuencia de FrpA/C.

El método de la invención también se puede usar para detoxificar las toxinas de *Bordetella* que incluyen adenilato ciclasa (CyaA) (Glaser (1988) Mol. Microbiol. 2; 19-30), toxina demonecrótica (Livey (1984) J. Med. Microbiol. 17; 91-103) y toxina de pertussis (PT) (Munoz et al (1981) Infect Immun 33; 820-828). El método de la invención también es útil para detoxificar la toxina del tétanos (TT) y toxina difteria (DT), y toxina de *S. aureus* y *S. epidermidis* incluyendo autolisina y hemolisina (WO01/58499, WO02/59145).

Los métodos de la invención conducen a una reducción de la cantidad de toxicidad y/o actividad hemolítica de la toxina de al menos 90%, preferiblemente 95%, 96%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% o 99.99% (la actividad hemolítica se mide usando el método del Ejemplo 3 y la toxicidad puede ser medida mediante el método del Ejemplo 5). La neumolisina nativa tiene una actividad hemolítica de 500,000 - 1,000,000 unidades por mg de neumolisina. Algunas variantes mutadas de punto han reducido la toxicidad y actividad hemolítica. La detoxificación de una neumolisina variante puede no lograrse tan grande como una disminución de porcentaje en la actividad hemolítica debido al punto de partida más bajo a partir del cual la actividad hemolítica es reducida, sin embargo se prevé que la mayoría de la actividad hemolítica remanente es removida mediante los métodos de la invención.

El paso de detoxificación del método de la invención provee preferiblemente una reacción de reticulación que es substancialmente no reversible. La reversibilidad es evaluada mediante el monitoreo del nivel de actividad hemolítica de la toxina detoxificada, directamente después de la detoxificación, y después de incubar a una temperatura por encima de 25°C, preferiblemente por encima de 30°C, más preferiblemente por encima de 35°C, lo más preferido por encima de 37°C por al menos 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días. Una reacción substancialmente reversible produce una detoxificación substancialmente no reversible y se define como una reacción en donde el

nivel de actividad hemolítica aumenta a menos del 100%, 60%, 40%, 30%, 20%, 10% después de la incubación a una temperatura elevada como de describe anteriormente. Muchos métodos de destoxificación, por ejemplo usando tratamiento de formaldehído, producen una destoxificación que no es estable, pero aumenta la toxicidad durante el tiempo.

En un paso preferido de destoxificación preferida del método de la invención, el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de la toxina retiene una estructura cuaternaria monomérica después de la reacción de reticulación. Muchos reactivos de reticulación forman reticulados intermoleculares (por ejemplo formaldehído y glutaraldehído). Esto puede afectar las propiedades inmunológicas de la toxina porque algunos epitopes se esconderán entre el agregado. Los métodos de la invención preferiblemente involucran simplemente la modificación de residuos de amino ácido, preferiblemente sulfhidrilo y/o grupos de amina primaria de amino ácidos y/o la formación de principalmente reticulados intramoleculares. La estructura cuaternaria monomérica resultante permite a los epitopes permanecer expuestos sobre la superficie de la toxina.

En una realización preferida del paso de destoxificación, el reactivo de reticulación es heterobifuncional. Los reactivos de reticulación preferidos contienen un grupo N-hidroxysuccinimida éster que reacciona preferencialmente, más preferiblemente específicamente, con grupos de amina primaria. Preferiblemente, los reactivos de reticulación contienen un grupo maleimida que reacciona preferencialmente, más preferiblemente específicamente, con grupos sulfhidrilo. A un pH de aproximadamente 7, un grupo maleimida reacciona 1000 veces más rápido con grupos sulfhidrilo que con aminas. Preferiblemente, el reactivo de reticulación contiene tanto un grupo N-hidroxysuccinimida éster como un grupo maleimida. El agente de reticulación es preferiblemente no clivable usando un agente reductor ya que esto conduce a destoxificación menos efectiva.

La distancia entre los grupos reactivos del agente de reticulación es capaz de efectuar la eficiencia de la destoxificación. Preferiblemente, la distancia entre los grupos del reactivo de reticulación que son reactivos con grupos amina y sulfhidrilo, es entre 1.5 y 20 ángstrom, más preferiblemente entre 5 y 15 ángstrom, y lo más preferidos aproximadamente 10 ángstrom, en el

método de la invención. Preferiblemente, los residuos de amino ácido sobre la toxina bacteriana son modificados mediante la adición de un grupo que es 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20, 50, 100, 500 ángstrom de longitud. Preferiblemente, el grupo modificador esté entre 5 y 100 ángstrom, más preferiblemente entre 10 y 20 ángstrom de tamaño.

El paso de destoxificación del método de la invención permite modificar suficientes residuos de forma que la interferencia estérica y/o cambios conformacionales inhiban la función de la toxina bacteriana. Preferiblemente, al menos 5, 7, 10, 12, 14, 16, 20 o 25 residuos de amino ácido de la toxina bacteriana son modificados. Cuando están presentes grupos maleimida no reaccionados en el reactivo de reticulación, se pueda usar una reacción de Ellman para estimar (indirectamente) el número de moléculas de reticulador unidas a cada molécula de toxina (Ellman 1969 Arch. Biochem. Biophys. 82; 70).

Los reactivos de reticulación preferidos son SMPT, Sulfo-LC-SMPT, Sulfo-KMUS, LC-SMCC, KMUA, Sulfo-LC-SPDP, LC-SPDP, Sulfo-SMPB, SMPH, Sulfo-SMCC, SMCC, SIAB, Sulfo-SIAB, GMBS (N-(γ-maleimidobutiriloxi)succinimida éster), Sulfo-GMBS, MBS, Sulfo-MBS, Sulfo-EMCS, EMCA, EMCS, BMPS, SPDP, SBAP, BMAP, AMAS, SATP y SIA (Pierce).

En un método preferido de la invención, la toxina es tratada con el compuesto químico o reactivo de reticulación bajo condiciones de pH entre 5.0 y 9.0, preferiblemente 6.5 a 8.0, más preferiblemente 7.0 a 7.8. En los tratamientos en donde la reacción de un grupo maleimida a un grupo sulfhidrilo es estimulada, el pH preferido de la reacción es 6.0 y 8.0, más preferiblemente 6.5 y 7.5. La concentración preferida de sales durante la reacción está entre 100 mM y 1M, más preferiblemente 150 mM y 500 mM, lo más preferido entre 200 mM y 300 mM. Sin embargo, los inventores han encontrado que algunas veces se prefiere realizar la reacción a una concentración de sal baja e donde no se adiciona cloruro de sodio u otra sal. Cuando la reacción se realiza a un pH entre 7.6 y 7.8, la reacción puede llevarse a cabo opcionalmente sin la adición de sal. Igualmente, el uso de

elecciones mayores de GMBS a toxina se puede realizar sin la adición de sal a valores de pH entre 7.0 y 8.0.

Preferiblemente se usa un exceso molar de 50-500, más preferiblemente 130-350 o 350-800, lo más preferido aproximadamente 250 veces del compuesto químico o reactivo de reticulación a cada toxina. La neumolisina neumocócica contiene 31 residuos de lisina. Por lo tanto, un exceso molar de 248 veces del compuesto químico o reactivo de reticulación sobre neumolisina es equivalente a un exceso molar de 8 veces del compuesto químico o reactivo de reticulación a cada residuo de lisina. Preferiblemente, se usa una relación molar de 2-20, más preferiblemente 4-15 o 15-30, lo más preferido aproximadamente 8 veces el compuesto químico o reactivo de reticulación a residuos de lisina, en los métodos de la invención.

El tratamiento con reactivo de reticulación procede por al menos 15 minutos, preferiblemente por al menos 30 minutos, lo más preferido para aproximadamente una hora entre 4°C y 40°C, preferiblemente entre 15°C y 25°C, lo más preferido a temperatura ambiente. El método de la invención pueda además comprender un paso de extinción usando un compuesto que contiene un grupo sulfhidrilo, preferiblemente el compuesto de extinción tiene un peso molecular sobre 50, 100 o 120, más preferiblemente el reactivo de extinción es un amino ácido, tal como cisteína. Alternativamente, los grupos pueden reaccionar con una mitad de péptido o poliacárido capaz de reaccionar con maleimida, por ejemplo un péptido que contiene un residuo de cisteína. Esto es particularmente apropiado cuando el grupo maleimida no reaccionado está presente antes del paso de extinción.

El paso de detoxificación es adecuado para uso sobre toxinas bacterianas como se describió anteriormente. Preferiblemente, la toxina bacteriana es de *Streptococcus pneumoniae*, lo más preferido, la toxina es neumolisina. La neumolisina es una proteína nativa o recombinante, o una proteína que ha sido diseñada genéticamente para reducir su toxicidad (como se describió anteriormente). Las proteínas de fusión de las toxinas, preferiblemente neumolisina o fragmentos de toxinas, preferiblemente neumolisina pueden ser detoxificadas usando el método de la invención.

Así, en una realización preferida, una toxina (tal como neumolisina) es destoxificada con un reactivo de reticulación que es preferiblemente heterobifuncional, que tiene grupos que son reactivos con residuos de leucina y cisteína, y es de cierto tamaño, teniendo preferiblemente los grupos reactivos espaciados 10-20 ángstroms lejos, de forma que cualquiera o preferiblemente ambos de los siguientes ocurra:

- a) entre 5 y 30, preferiblemente aproximadamente 12-14 residuos de amino ácido de la toxina son modificados por una molécula reticuladora enlazada covalentemente, preferiblemente a un residuo de leucina o arginina (preferiblemente, como se midió indirectamente por una reacción e Elman), siendo el otro extremo extinguido (preferiblemente con cisteína) y/o:
- b) una cadena lateral de cisteína involucrada en la actividad tóxica de la toxina (preferiblemente hacia el terminal C de la toxina) es reticulada a otra cadena lateral de la toxina (preferiblemente a un residuo de leucina o arginina) que está preferiblemente separada por más de 2, 5, 10, 20, 30 o 40 amino ácidos del residuo de cisteína en la secuencia primaria de la toxina.

En una realización preferida adicional, una toxina (preferiblemente neumolisina) es destoxificada con un compuesto químico monofuncional que reacciona preferiblemente con amino ácidos que contienen un grupo amina primaria, más preferiblemente leucina, y es de cierto tamaño, más preferiblemente 10-100 ángstroms de forma que la toxina es recubierta con entre 5 y 30, más preferiblemente aproximadamente 14 compuestos químicos enlazados a residuos de amino ácido.

Conjugados de polisacárido

Un problema asociado con el criterio de polisacárido con la vacunación, es el hecho que los polisacáridos *per se* son inmunógenos pobres. Para superar esto, los polisacáridos pueden estar conjugados con vehículos de proteína, lo cual proporciona ayuda circunstante a las células T. El proceso de la invención puede ventajosamente contener un paso adicional de conjugación de la citolisina, preferiblemente neumolisina, con un polisacárido bacteriano,

por ejemplo un lipo-oligosacárido preferiblemente, un polisacárido capsular.

Un conjugado preferido de la invención comprende citolisina, preferiblemente neumolisina, obtenida mediante el método de la invención, conjugada a polisacáridos conjugados derivados de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de polisacárido capsular neumocócico son seleccionados preferiblemente de serotipos 1, 2, 3, 4, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (más preferiblemente de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 18C, 19F y 23F), o mezclas de dos o más de dichos conjugados (4, 7, 9, 11, 13 o 23).

La citolisina, preferiblemente neumolisina, purificada mediante el proceso de la invención también está preferiblemente conjugada a polisacáridos capsulares de otras cepas de bacterias. Tales polisacáridos pueden ser aislados de, por ejemplo, H. influenzae, H. influenzae tipo B (Hib), N. meningitis grupos A, C, W, Y, Estreptococos diferentes de *S. pneumoniae* (e.g., Estreptococo Grupo B, *S. pyogenes*, etc.), Estafilococo (e.g., *S. aureus*, *S. epidermidis*), *E. coli*, Enterococo (e.g., *E. faecalis* y *E. faecium*), etc. Preferiblemente, los polisacáridos son de H. influenzae tipo B (Hib), y/o N. meningitis grupos A, C, W135, y/o Y.

El polisacárido puede ser enlazado a citolisina, preferiblemente neumolisina, mediante cualquier método conocido (por ejemplo, mediante Likhite, Patente U.S. 4,372,945 y por Amor et al., Patente U.S. 4,474,757). Preferiblemente, se realiza la conjugación de CDAP (WO 95/08348). Para mejorar la inmunogenicidad, los polisacáridos pueden ser adyuvados y/o liofilizados. Los polisacáridos de la invención pueden ser de tamaño completo, ajustados después de la purificación a polisacáridos u oligosacáridos más pequeños.

El proceso de la invención comprende preferiblemente un paso adicional de formulación de citolisina, preferiblemente neumolisina en una vacuna.

Proteínas y composiciones inmunogénicas

Una realización adicional de la invención es citolisina, preferiblemente neumolisina, purificada mediante el método de la invención. Esto incluye un conjugado de neumolisina-polisacárido capsular bacteriano hecho mediante el proceso de la invención.

Una realización adicional de la invención es una composición inmunogénica que comprende citolisina, preferiblemente neumolisina o neumolisina-polisacárido capsular bacteriano, obtenido mediante el proceso de la invención (como se describió anteriormente).

La composición inmunogénica de la invención comprende además preferiblemente uno o más miembros de la familia de proteína enlazante de colina neumocócica, preferiblemente proteína A enlazante de colina, o un fragmento inmunogénico de esta y/o uno o más miembros de la familia triada de polihistidina (incluyendo proteínas de fusión de esta), preferiblemente PhtA, PhtB, PhtD o PhtE, o un fragmento inmunogénico de estas.

Con respecto a la familia de proteína enlazante de colina (CbpX), los miembros de esta familia fueron originalmente identificados como proteínas neumocócicas que podrían ser purificadas mediante cromatografía de afinidad a colina. Todas las proteínas enlazantes de colina son enlazadas no covalentemente a las mitades fosforocolina del ácido teicóico de la pared celular y el ácido lipoteicóico asociado a la membrana. Estructuralmente, tienen varias regiones en común sobre la familia entera, aunque la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia de amino ácido, longitud, etc.) puede variar. En general, las proteínas enlazantes de colina comprenden una región terminal N (N), regiones repetidas conservadas (R1 y/o R2), una región rica en prolina (P) y una región enlazante de colina conservada (C), preparada de múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente la mitad de la proteína. Como se usa en esta solicitud, el término "Familia de Proteína Enlazante de Colina (CbpX)" es seleccionado del grupo consistente de Proteínas Enlazantes de Colina como se identifican en WO97/41151, PbcA, SpaA, PspC, CbpA, CbpD y CbpG. La CbpA se revela en WO97/41151. Las CbpD y CbpG están reveladas en WO00/29434. La PbpC está revelada en WO97/09994. La CbpA está revelada en

WO98/21337. La SpcA es una proteína enlazante de colina revelada en WO 98/39450. Preferiblemente, las Proteínas Enlazantes de Colina son seleccionadas del grupo consistente de CbpA, PbcA, SpcA y PspC.

Otra realización preferida son truncados de CbpX, en donde "CbpX" se define anteriormente, y "truncados" se refiere a proteínas CbpX que carecen del 50% o más de la región enlazante de colina (C). Preferiblemente, tales proteínas carecen de la región entera enlazante de colina. Más preferiblemente, tales truncados de proteína carecen de (i) la región enlazante de colina, y (b) también una porción de la mitad del terminal N de la proteína, aunque retiene al menos una región de repetición (R1 o R2). Aún más preferiblemente, el truncado tiene 2 regiones de repetición (R1 y R2), más preferiblemente, el truncado retiene la región rica en prolina (P). Ejemplos de tales realizaciones preferidas son NR1xR2 y R1xR2 como se ilustran en WO99/51288 o WO98/51188, y NR1XR2P, sin embargo, también se contemplan otras proteínas enlazantes de colina que carecen de una región similar enlazante de colina, dentro del alcance de esta invención.

La familia LytX es proteína asociada a membrana, asociada con lisas de célula. El dominio del terminal N comprende dominio(s) enlazantes de colina, sin embargo, la familia LytX no tiene todas las características encontradas en la familia CbpA notada anteriormente, y así, la familia LytX se considera distinta de la familia CbpX. En contraste con la familia CbpX, el dominio del terminal C contiene el dominio catalítico de la familia de proteína LytX. La familia comprende LytA, B y C. Con respecto a la familia LytX, la LytA está revelada en Ronda et al., Eur J Biochem, 164:821-824 (1987). La LytB está revelada en WO 98/18830, y también es referida como Sp48. La LytC también está revelada en WO 98/18830, y también es referida como Sp81. Un miembro preferido de esta familia es LytC.

Otra realización preferida son los truncados LytX en donde "LytX" está definida anteriormente, y "truncados" se refiere a proteínas LytX que carecen del 50% o más de la región enlazante de Colina. Preferiblemente, tales proteínas carecen de la región entera enlazante de Colina. Un ejemplo de tales truncados se pueda encontrar en la sección de Ejemplos de esta invención.

Ya otra realización preferida de esta invención son las proteínas quiméricas de truncado CMPC-truncado LytX (o fusiones). Preferiblemente, esto comprende NR1XR2 (o R1xR2, o NR1XR2P) de CbpX y la porción del terminal C (Cterm, i.e., carencia de los dominios de enlace de colina) de LytX (e.g., LytCCterm o Sp91Cterm). Más preferiblemente, la CbpX es seleccionada del grupo consistente de CbpA, PbcA, SpsA y PspC. Aún más preferiblemente, es CbpA. Preferiblemente, LytX es LytC (también referida como Sp91).

Otra realización de la presente invención es un PspA o PsaA, o truncados que carecen del dominio enlazante de colina (C) opcionalmente expresada como una proteína de fusión con LytX. Preferiblemente, LytX es LytC.

La familia Pht (Tríada de Poli histidina) comprende proteínas PhtA, PhtB, PhtD y PhtE. La familia es caracterizada por una secuencia de lapidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y varias tríadas de histidina, posiblemente involucrados en el enlace actividad enzimática de metal o nucleósido, regiones de espiral enrollado (3-5), un terminal N conservado y un terminal C heterogéneas. Está presente en todas las cepas de neumococos probadas. También se han encontrado proteínas homólogas en otros estreptococos y Neisseria. Los miembros preferidos de la familia comprenden PhtA, PhtB y PhtD. Más preferiblemente, comprende PhtA y PhtD. Se entiende, sin embargo, que los términos Pht A, B, D y E se refieren a proteínas que tienen las secuencias reveladas en las citaciones siguientes, así como variantes de estas que se encuentran naturalmente (y hechas por el hombre), que tienen una homología de secuencia que es al menos 90% idéntica a las proteínas referenciadas. Preferiblemente, es al menos 95% idéntica, y lo más preferido, es 97% idéntica.

La composición inmunogénica de la invención puede incorporar proteínas de fusión o proteínas de tríada de histidina. Las proteínas de fusión preferidas contienen i) PhtD o un fragmento de esta, enlazada a una PhtE o un fragmento de esta, o ii) PhtB o un fragmento de esta, enlazada a una PhtE fragmento de esta.

Con respecto a las proteínas PhtX, la PhtA está revelada en WO 98/18930, y es también referida como Sp36. Como se notó anteriormente, es una

proteína de la familia triada de polihistidina y tiene el motivo de señal tipo II de LXXC.

La PhtD está revelada en WO 00/37105, y también se refiere como Sp038D. Como se notó anteriormente, también es una proteína de la familia triada de polihistidina y tiene el motivo de señal tipo II de LXXC. La PhtB está revelada en WO 00/37105, y es también referida como Sp036. Otro miembro de la familia PhtB es el Polipéptido de Degradación de C3, como se revela en WO 00/17370. Esta proteína también es de la familia triada de polihistidina y tiene el motivo de señal tipo II de LXXC. Un equivalente inmunológicamente funcional preferido es la proteína Sp42, revelada en WO 98/18930. Un truncado de PhtB (aproximadamente 79 kD) está revelado en WO99/16675 que también se considera un miembro de la familia PhtX.

La PhtE está revelada en WO00/30299 y está referida como BVH-3.

Con el fin de generar una composición inmunogénica de la invención, capaz de producir una respuesta inmune contra más de un patógeno involucrado en la otitis media, es ventajoso que las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden además un antígeno de uno o más (2, 3, 4, 5, 6) de *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* no clasificable, *Moraxella catarrhalis*, RSV, virus de parainfluenza y/o virus de influenza.

La presente invención también contempla vacunas de combinación que proveen protección contra un rango de diferentes patógenos. Muchas vacunas pediátricas son ahora administradas como una vacuna de combinación con el fin de reducir el número de inyecciones que un niño tiene que recibir. Así, para las vacunas pediátricas se pueden formular antígenos de otros patógenos con las vacunas de la invención. Por ejemplo, las vacunas de la invención se pueden formular con (o administrar separadamente pero al mismo tiempo) la bien conocida vacuna de combinación "trivalente" que comprende toxoide Difteria (DT), toxoide tetanos (TT) y componentes pertusis [típicamente toxoide Pertussis destoxificada (PT) y hemaglutinina filamentosas (FHA) con peractina opcional (PRN) y/o aglutinina 1-2], por ejemplo, la vacuna comercializada INFANRIX-DTPa™ (SmithKlineBeecham Biologicals) que contiene antígenos de DT, TT, PT y FHA y PRN, con un componente de pertusis de célula entera.

28

por ejemplo, como el comercializado por SmithKlineBeecham Biologicals s.a., como Tritanrix™. La vacuna combinada también comprende otro antígeno, tal como antígeno de superficie de Hepatitis B (HbsAg), antígenos del virus Polio (por ejemplo, virus de polio trivalente inactivado – IPV), proteínas de membrana exterior de *Moraxella catarrhalis*, proteínas de *Haemophilus Influenzae* no clasificable, proteínas de membrana exterior de *N.meningitidis* B.

Ejemplos de antígenos de proteína de *Moraxella catarrhalis* que se pueden incluir en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de la otitis media) son: OMP106 [WO 97/41731 (Antas) & WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA &/o LbpB [WO 98/55806 (PMC)]; TbpA &/o TbpB [WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, et al. (1993) Infect. Immun. 61: 2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824); PIQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); lipo6 (GB 9917977.2); lipo10 (GB 9918208.1); lipo11 (GB 9918302.2); lipo16 (GB 9918038.2); P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); OmpIA1 (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257); y OmpE. Ejemplos de antígenos de *Haemophilus Influenzae* no clasificable que se pueden incluir en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de otitis media) incluyen: Proteína fimbria [(US 5766806 – Ohio State Research Foundation)] y fusiones que comprenden péptidos de esta [eg péptidos de fusión de LB1(f); US 5843464 (OSU) o WO 99/64067]; OMP26 [WO 97/01638 (Corteca)]; p6 [EP 281673 (State University of New York)]; TbpA y/o TbpB; Hla; Hsf; Hln47; Hlf; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (WO 94/12641); proteína D (EP 594610); P2; y P5 (WO 94/26304).

Otras combinaciones contempladas son la citolisina, preferiblemente neumolisina de la invención en combinación con antígenos virales, por ejemplo, de influenza (atenuada, dividida, o subunidad [e.g., neuraminidasa de glicoproteínas de superficie (NA) y hemaglutinina (HA). Ver, e.g., Chaloupka I. et al. Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15:121-127], RSV (e.g., antígenos F y G o fusiones F/G, ver, e.g., Schmidt A. C. et al, J Virol, Mayo 2001, 94594-4603), virus 3 de parainfluenza (PIV3) (e.g., proteínas HN y F, ver Schmidt et al. supra), Varicela (e.g., atenuada, glicoproteínas I-V, etc), y cualquiera (o todos) los componentes de MMR (sarampión, paperas, rubéola).

Vacunas

Una realización adicional de la invención es una vacuna que comprende citolisina, preferiblemente neumolisina o un conjugado neumolisina-polisacárido capsular bacteriano, obtenido mediante el proceso de la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un adyuvante.

Una vacuna de la invención puede comprender las composiciones inmunogénicas de la invención descritas anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las vacunas de la invención son capaces de generar una respuesta inmune protectora contra la infección de *S. pneumoniae* y/o otitis media.

Una realización adicional de la invención incluye un método para hacer una vacuna tomando una citolisina, preferiblemente neumolisina, preparada mediante el proceso de la invención, y formularla como una vacuna con excipiente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente con uno o más de los antígenos adicionales descritos anteriormente.

Una realización adicional de la invención incluye el método de tratamiento o prevención de la infección bacteriana, preferiblemente infección de *Streptococcus pneumoniae* u otitis media, que comprende la administración de la vacuna o composición inmunogénica de la invención.

Una realización adicional de la invención es el uso de la citolisina, preferiblemente neumolisina y/o conjugado neumolisina-polisacárido capsular bacteriano, cualquiera de los cuales es obtenido mediante un proceso de la invención, en la preparación de una vacuna para el tratamiento o prevención de infección bacteriana, preferiblemente infección de *Streptococcus pneumoniae* u otitis media.

Las vacunas de la presente invención están preferiblemente adjuvadas. Adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, magnesio, hierro o zinc, o puede ser una suspensión

insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos derivatizados catiónicamente o aniónicamente, o polifosfazenas.

Se prefiere que el adyuvante sea seleccionado para ser un inductor preferencial de un tipo TH1 de respuesta. Tales niveles altos de citocinas tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células, a un antígeno dado, mientras que los niveles altos de citocinas tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales al antígeno.

Es importante recordar que la distinción de la respuesta inmune tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad, un individuo soporta una respuesta inmune que describe como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, usualmente es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de lo descrito en los clones de célula CD4 + ve T por Mosmann and Coffman (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Tradicionalmente, las respuestas tipo Th1 están asociadas con la producción de las citocinas INF- γ e IL-2 mediante T-linfocitos. Otras citocinas usualmente directamente asociadas con la inducción de respuestas inmunes tipo Th1, no son producidas por las células T, tal como IL-2. En contraste, las respuestas tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Sistemas de adyuvante adecuados que promueven una respuesta predominantemente Th1 incluyen: lípido A Monofosforilo o un derivado de este, particularmente lípido A 3-dee-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación ver GB 2220211 A); y una combinación de lípido A monofosforilo, preferiblemente lípido A 3-dee-O-acilado, junto con o una sal de aluminio (por ejemplo, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o una emulsión aceite-en-agua. En tales combinaciones, el antígeno y el 3D-MPL están contenidos en las mismas estructuras de partícula, permitiendo la entrega más eficiente de señales antigénicas e inmunoestimuladoras. Los estudios han mostrado que la 3D-MPL es capaz de mejorar más la inmunogenicidad de un antígeno adsorbido por alumbre [Thoelen et al. Vaccine (1998) 16:706-14; EP 689454-B1].

Un sistema mejorado involucra la combinación de un lípido A monofosforilo y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se revela en WO 94/00153, una composición menos reactogénicas, en donde el QS21 es extinguido con colesterol, como se revela en WO 98/33739.

Una formulación de adyuvante particularmente potente que involucra QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión aceite en agua, está descrita en WO 98/33739.

Preferiblemente, la vacuna comprende adicionalmente una saponina, más preferiblemente QS21. La formulación también puede comprender una emulsión aceite en agua y tocoferol (WO 98/17210).

La presente invención también provee un método para producir una formulación de vacuna que comprende el mezclado de una citolisina de la presente invención junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como 3D-MPL.

CpG no metilada que contiene oligonucleótidos (WO 98/02555) también son inductores preferenciales de una respuesta Th1 y son adecuados para uso en la presente invención.

En un aspecto adicional de la presente invención se provee una vacuna como se describe aquí, para uso en medicina. En una realización, hay un método para prevenir o mejorar la neumonía en un humano eciano (por encima de los 55 años de edad), que comprende la administración de una cantidad segura y efectiva de una vacuna de la invención, y opcionalmente un adyuvante de Th1, a dicho paciente eciano.

En una realización adicional, se provee un método para prevenir o mejorar la otitis media en infantes (hasta 24 meses) o niños pequeños (típicamente 24 meses a 5 años), que comprende la administración de una cantidad segura y efectiva de vacuna, que comprende una citolisina, preferiblemente neumolisina de la invención, opcionalmente con uno o más de los antígenos adicionales descritos anteriormente, y opcionalmente un adyuvante de Th1, a dicho infante niño pequeño.

Las preparaciones de vacuna de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar un mamífero (preferiblemente un paciente humano) susceptible a infección, por medio de la administración de dicha vacuna vía ruta sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir inyección vía ruta intramuscular, interperitoneal, intradérmica o subcutánea; o vía administración mucosa a los tractos oral/alimenticio, respiratorio, genitourinario. Se prefiere la administración intranasal de vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media (en la medida en que el transporte nasofaríngeo de neumococos pueda ser más efectivamente prevenido, atenuando así la infección en su etapa más temprana). Aunque la vacuna de la invención puede ser administrada como una dosis simple, los componentes de este pueden también ser co-administrados juntos al mismo tiempo o a tiempos diferentes (por ejemplo si los polisacáridos están presentes en una vacuna, estos podrían ser administrados separadamente al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de la combinación de proteína bacteriana para coordinación óptima de las respuestas inmunes con respecto a la otra). Además de una sola ruta de administración, se pueden usar dos rutas diferentes de administración. Por ejemplo, los antígenos virales pueden ser administrados ID (intradérmica), mientras las proteínas bacterianas pueden ser administradas IM (intramuscularmente) o IN (intranasalmente). Si los polisacáridos están presentes, pueden ser administrados IM (o ID) y las proteínas bacterianas pueden ser administradas IN (o ID). Adicionalmente, las vacunas de la invención pueden ser administradas IM para dosis principales, e IN para dosis de refuerzo.

La cantidad de antígeno conjugado en cada dosis de vacuna es seleccionado como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos de las vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo del inmunógeno específico que es empleado y cómo está presentado. El contenido de antígenos de proteína en la vacuna, estarán típicamente en el rango de 1-100 mg, preferiblemente 5-50 μ g, lo más preferidos típicamente en el rango de 5-25 μ g. Si están incluidos los polisacáridos, se espera generalmente que cada dosis comprenderá 0.1-100 μ g de polisacárido, preferiblemente

0.1-50 μg , más preferiblemente 0.1-10 μg , de los cuales 1 a 5 μg es el rango más preferido.

Las cantidades óptimas de componentes para una vacuna particular pueden ser determinados mediante estudios estándar que involucren la observación de respuestas inmunes apropiadas en los sujetos. Siguiendo una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas. Típicamente, una vacuna comprenderá antígeno (proteínas), un adyuvante, y excipientes o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La preparación de la vacuna se describe generalmente en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). La encapsulación dentro de liposomas se describe en Fullerton, Patente US 4,235,877.

Aunque las vacunas de la presente invención pueden ser administradas por cualquier ruta, la administración de las vacunas descritas en la piel (ID) forma una realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula "córneas" exterior llamada el estrato córneo, que recubre la epidermis. Bajo esta epidermis está una capa llamada la dermis, que a su vez recubre el tejido subcutáneo. Los investigadores han mostrado que la inyección de una vacuna en la piel, y en particular la dermis, estimula una respuesta inmune, que también puede estar asociada con un número de ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas aquí forma una característica preferida de la presente invención.

La técnica convencional de la inyección intradérmica, el "procedimiento mantoux" comprende los pasos de limpieza de la piel, y luego estiramiento con una mano, y con el borde de una aguja medidora delgada (medida 26-31) mirando hacia la aguja, es insertada en un ángulo entre 10-15°. Una vez el borde de la aguja es insertado, la tubo de la aguja desciende y además avanza mientras se provee una ligera presión para elevarla bajo la piel. El líquido es entonces inyectado muy lentamente formando así una ampolla o bomba sobre la superficie de la piel, seguido del retro lento de la aguja.

Más recientemente, se han descritos dispositivos que son diseñados específicamente para administrar agentes líquidos en o a lo largo de la piel, por ejemplo, los dispositivos descritos en WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección de chorro descritos por ejemplo en WO 01/13977; US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 y WO 97/13537. Los métodos alternativos de la administración intradérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para entrega balística de vacunas sólidas (WO 99/27961), o parches transdérmicos (WO 97/48440; WO 98/28037); o aplicados a la superficie de la piel (entrega transdérmica o transcutánea WO 98/20734; WO 98/28037).

Cuando las vacunas de la presente invención son para ser administradas a la piel, o más específicamente en la dermis, la vacuna está en un volumen bajo de líquido, particularmente un volumen entre aproximadamente 0.05 ml y 0.2 ml.

El contenido de antígenos en la piel o las vacunas intradérmicas de la presente invención pueden ser similares a las dosis convencionales que las encontradas en las vacunas intramusculares. En consecuencia, los antígenos de proteína presentes en las vacunas intradérmicas pueden estar en el rango 1-100 µg, preferiblemente 5-50 µg. Asimismo, si está presente, la cantidad antígeno de conjugado de polisacárido en cada dosis de vacuna se espera que generalmente comprenda 0.1-100 µg de polisacárido, preferiblemente 0.1-50 µg, preferiblemente 0.1-10 µg y puede estar entre 1 y 5 µg. Sin embargo, es una característica de las vacunas de piel intradérmicas, que las formulaciones sean de "dosis baja". En consecuencia, los antígenos de proteína en vacunas de "dosis baja" están preferiblemente presentes tan pequeñas como 0.1 a 10 µg, preferiblemente 0.1 a 5 µg por dosis, y si están presentes, los antígenos de conjugado de polisacárido pueden estar presentes en el rango de 0.01-1 µg, y preferiblemente entre 0.01 a 0.5 µg de polisacárido por dosis.

Como se usa aquí, el término "entrega intradérmica" significa entrega de la vacuna en la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna no está necesariamente localizada exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa de la piel localizada entre aproximadamente 1.0 y aproximadamente 2.0 mm de la superficie de la piel humana, pero hay una cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar alcanzar la dermis al ir 1.5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis está localizada entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea por debajo. Dependiendo del modo de entrega, la vacuna puede finalmente ser localizada solamente o principalmente dentro de la dermis, o puede finalmente ser distribuida dentro de la epidermis y la dermis.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la invención pueden ser evaluadas en diferentes modelos de animales o con suero humano. Como una ilustración, los siguientes modelos de animales se pueden usar para evaluar la infección neumocócica. Ratones C3H/HeJ (8 a 8 semanas de edad) pueden ser inmunizados s.c. con 15 µg de proteína ayudada con 50 µl de CFA, seguido de 3-4 semanas después de refuerzo con 15 µg de proteína con IFA. Para demostrar la protección pasiva y activa de la infección sistémica, los ratones pueden ser administrados intraperitonealmente con suero inmune o proteínas antes del sometimiento, mediante inyección intraperitoneal con 15 a 90 neumococos LD50 a la semana 8-10. Adicionalmente, las proteínas pueden ser probadas en un modelo de colonización nasofaríngea de ratón mediante (Wu et al Microbial Pathogenesis 1997; 127-137).

Además de los ratones, las ratas infantiles son susceptibles de colonización e infección por *S. pneumoniae*. En estudios protectores pasivos, la administración de suero inmune de ratón (100 µl i.p. o 10 µl i.n.) se puede hacer antes del sometimiento con administración intranasal de *S. pneumoniae* (10 µl) en crías de rata infante de 2-5 días de edad. La colonización se puede determinar mediante lavados nasales de placa (20-40 µl infundidos, 10 µl retirados).

Las interacciones favorables entre los componentes de proteína (o proteína y polisacárido) de la vacuna de combinación se pueden demostrar mediante la administración de una dosis de cada proteína (o proteína y polisacárido) en la vacuna, que sería sub-protectora en una vacuna monovalente. La eficacia protectora aumentada de la vacuna de combinación comparada con las vacunas monovalentes se puede atribuir a una interacción favorable entre los componentes.

La invención está ilustrada en los ejemplos acompañantes. Los ejemplos se realizan usando técnicas estándar, que son bien conocidas y de rutina para los expertos en la técnica, excepto cuando se describe en detalle de otra forma. Los ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Purificación de neumolisina

Después de 18 horas de inducción del cultivo de *E. coli* mediante el aumentando la temperatura hasta 39.5°C, las *E. coli* fueron paletizadas mediante centrifugación a 17,000g por 1 hora. El pellet fue resuspendido en dietanolamina 25 mM pH 9.0 y las *E. coli* fueron quebradas mecánicamente usando una pasada a 500 PSI en un aparato Rannie. Se agregó lauroil sarcosinato de sodio al 1% (SLS) a la *E. coli* quebrada, y la mezcla se incubó por 1 hora a temperatura ambiente antes de la centrifugación a 30,000 g por 20 minutos, de forma que el residuo celular fue pelletizado. El sobrenadante se diluyó 2.5 veces hasta terminar en fosfato 20 mM pH 7.0 que contenía NaCl 1M y SLS al 1%, y fue luego cargado en una columna HP de fenil-esferosa equilibrada en el mismo amortiguador (fosfato 20 mM pH 7.0 que contiene NaCl 1M y SLS al 1% = amortiguador de equilibrio). La columna fue lavada con 4 volúmenes de columna de amortiguador de equilibrio seguido por 2 volúmenes de columna de amortiguador de fosfato 20 mM pH 7.0 que contiene NaCl 0.5M y SLS al 1%. La neumolisina se eluyó de la columna aplicando un amortiguador bajo en sal que contiene amortiguador de fosfato 20 mM pH 7.0 que contiene SLS al 1%. Las fracciones que contenían neumolisina fueron identificadas usando análisis de SDS-PAGE, fueron recolectadas y el amortiguador se intercambió a dietanolamina 25 mM pH 9.0 usando diálisis.

La neumolisina fue solubilizada mediante desnaturalización adicionando clorhidrato de guanidina sólida hasta una concentración final 6M e incubando por una hora. Fue entonces dialfiltrada contra urea 8M en dietanolamina 25 mM pH 9.0 que contenía DTT 1 mM. La neumolisina fue replegada mediante dialfiltración contra amortiguador de borato 20 mM pH 9 que contenía DTT 1 mM. Después de la renaturalización, el DTT fue removido mediante dialfiltración contra amortiguador de borato 20 mM pH 9.0.

La pureza de la neumolisina alcanzada se analizó corriendola en un SDS-PAGE y coloreado con azul brillante de Coomassie. Un gel separado fue analizado mediante manchado Western usando un anticuerpo contra E. coli para detectar en nivel de proteínas E. coli remanentes en la preparación de neumolisina purificada. La actividad biológica de la neumolisina purificada se evaluó usando un ensayo de hemólisis in vitro.

Resultados

Como se muestra en la figura 1, el método descrito anteriormente fue capaz de producir una purificación altamente eficiente de neumolisina después de un solo paso de cromatografía. El Panel A muestra que la elusión de la columna con un amortiguador bajo en sal que contiene cloruro de sodio no adicionado, fue capaz de eluir una banda de 53kDa correspondiente a la neumolisina de la columna, en una forma altamente purificada. También se piensa que la banda muy tenue de aproximadamente 45 kDa es neumolisina porque esta segunda banda se enlaza a los anticuerpos anti-neumolisina (resultados no mostrados) y también falla en enlazarse a anticuerpos anti E. coli, como se muestra en el panel B. El manchado Western del panel B es un método altamente sensible para detectar cualquier proteína contaminante que permanece en la neumolisina purificada. Este método fue capaz de detectar muy pocos contaminantes, y aquellos presentes fueron a un nivel bajo que estaba por debajo de un nivel de 98-100% de pureza.

El rendimiento del método de purificación también es bueno con una corrida típica, produciendo aproximadamente 1900 mg de neumolisina por litro de fermentación. Aproximadamente el 10% de la proteína del cultivo de fermentación se recuperó como neumolisina purificada.

Se evaluó la actividad de la neumolisina en un ensayo de hemólisis después que la neumolisina había sido tratada con clorhidrato de guanidinoácidos, y había sido replegada mediante la remoción del desnaturizante. La actividad hemolítica se detectó en diluciones de la neumolisina purificada hasta concentraciones de 1.3 ng/ml, mostrando que la actividad hemolítica había sido re-establecida. Esto corresponde entre 500,000 y 1,000,000 unidades hemolíticas por mg de neumolisina tipo nativa.

Ejemplo 2 - Destoxificación de neumolisina de *S. pneumoniae* usando GMBS

La neumolisina purificada fue destoxificada mediante la modificación de los grupos sulfhidrilo y amina primaria, usando el reactivo de reticulación NHS éster - maleimida GMBS (N-(γ-maleimidobutirilo)succinimida éster). La neumolisina a una concentración de 0.5 mg/ml, fue dializada contra amortiguador de fosfato 50 mM pH 7.0. El GMBS se disolvió inicialmente en DMSO y se agregó a neumolisina en un exceso molar de 248 veces de GMBS. El tratamiento continuó por una hora a temperatura ambiente. El exceso de GMBS y sub-productos fueron removidos mediante diálisis contra fosfato de sodio 100 mM pH 6.8. Los grupos adicionales de maleimida fueron extinguidos mediante la reacción con 0.6 mg/ml de cisteína por dos horas a temperatura ambiente. Con el fin de remover el exceso de cisteína, la muestra fue dializada contra fosfato de sodio 2 mM pH 7.15.

Ejemplo 3 - Caracterización de neumolisina destoxificada

Actividad Hemolítica

Se usó un ensayo hemolítico para evaluar la toxicidad remanente de la neumolisina destoxificada. Diluciones de 2 veces series de neumolisina fueron incubadas con glóbulos rojos de oveja. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue transferido a inmunoplaques y la hemoglobina liberada fue medida usando densidad óptica que lee a 405 nm. Los resultados fueron expresados como ng/ml de neumolisina correspondiente al punto medio de la curva OD. El ensayo se repitió después de la incubación de la

neumolisina destoxificada a 37°C por 7 días para monitorear la reversibilidad de destoxificación.

Como se muestra en la tabla 1, el tratamiento con GMBS fue capaz de reducir substancialmente la actividad hemolítica de PLY con una reducción de hasta 3,000 veces en la actividad hemolítica que se alcanza. Las relaciones molares mayores de GMBS/lisina fueron capaces de producir mejor remoción de actividad hemolítica con relaciones de 4/1 y 5/1, que son óptimas en este experimento. Se estimó que este tratamiento produce una modificación de aproximadamente 14 residuos de lisina. Cuando se modifican menores residuos de lisina, la reducción de la actividad hemolítica fue menor.

ELISA

Se evaluó la antigenicidad de la neumolisina ~~destoxificada~~ mediante ELISA. Las placas de ELISA fueron recubiertas con un anticuerpo anti-neumolisina de conejillo de indias. Las muestras que contienen diluciones de neumolisina fueron incubadas en las placas por 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, la neumolisina enlazada fue detectada usando anticuerpos policlonales de conejo contra neumolisina, conjugada con peroxidasa de rábano picante. Después del lavado de las placas, se usó una reacción de sustrato para evaluar la cantidad de neumolisina enlazada a cada agujero.

Como se muestra en la tabla 1, el tratamiento con GMBS condujo a alguna pérdida de antigenicidad como se evaluó mediante ELISA. Sin embargo, las lecturas de ELISA de aproximadamente 66% de aquellas dadas por PLY no tratada podrían alcanzarse mostrando que muchos anticuerpos podrían aún reconocer la neumolisina modificada.

Análisis SDS-PAGE

Las proteínas de neumolisina destoxificadas fueron corridas en un SDS-PAGE (gel de poliacrilamida Novex 4-20% Invitrogen), y se usó azul brillante Coomassie para visualizar las proteínas. Como se muestra en la Figura 2, el tratamiento con GMBS condujo a un ligero aumento en el peso

molecular de PLV de 53 kDa a aproximadamente 56 kDa. Este aumento se debe a la modificación de múltiples residuos de amino ácido con GMBS. Un pequeño porcentaje de PLV se convierte a formas multiméricas como se ve mediante la aparición de bandas tenues de peso molecular de aproximadamente 110 kDa y 170 kDa, sin embargo, la mayoría de la PLV permanece en una forma esencialmente monomérica. La incubación de la PLV a 37°C por 7 días no produce ningún cambio substancial en la aparición de la PLV sobre un SDS-PAGE que muestra que la PLV modificada no está sujeta a degradación o formación posterior de multímero enlazado covalentemente.

Tabla 1: Ensayos de detoxificación de PLV mediante GMBS

Ensayo	Exceso de GMBS (GMBS/lisina)	Funciones de maleimida	Relación		Título hemolítico	
			ELISA/LOWRY		Ng/ml	
			4°C	7D37°C	4°C	7D37°C
			%			
1	/	/	95	56	1.7	4.2
	1/1	8	63	87	186	111
	1.5/1	8.5	69	/	48	/
	2/1	9.4	7	/	309	/
	3/1	11.8	56	/	530	/
	4/1	13.5	66	/	6308	/
	5/1	14.2	67	/	4284	/
2	4/1	13.8	26.2	24.8	NH	NH
	8/1	17.6	23.9	38.0	NH	NH
3	4/1	11.3	89	46	1598	6309

Los ensayos fueron realizados sobre 1 mg de PLV (1 mg/ml) excepto por el último ensayo para el cual se trataron 3 mg (PLV a 0.66 mg/ml).

Ejemplo 4 Evaluación de Reactogenicidad de neumolisina detoxificada en ratas

Grupos de tres ratas OFA fueron inmunizadas una vez mediante inoculación intramuscular (tibial) con solución salina, el adyuvante QS21 (US 5,057,540), neumolisina, neumolisina adyuvada, neumolisina detoxificada

con formaldehído, neumolisina destoxificada con formaldehído adyuvada, neumolisina destoxificada con GMBS, neumolisina destoxificada con GMBS adyuvada, neumolisina destoxificada con NHS-acetato o neumolisina destoxificada con NHS-acetato adyuvada. Tres días después de la inmunización, todas las ratas fueron sacrificadas y las tibias fueron preparadas para examen histológico. Las tibias fueron fijados en formalina y cortados en talas de 2 mm que fueron deshidratadas e incorporadas en parafina. Se cortaron secciones de 7 μ m y se colorearon usando el método Trichrome Masson, antes de ser examinadas microscópicamente.

Se evaluó la reactividad usando cuatro criterios: degeneración/necrosis, inflamación endomisial, hemorragia e inflamación aponeurosis. Para cada criterio histológico, se atribuyó un puntaje a cada músculo de cada grupo, y entonces se calculó un puntaje de lesión medio para cada grupo. Un puntaje de 0 = normal, 1 = mínima, 2 = leve, 3 = moderada, 4 = marcada y 5 = severa.

Resultados

Se examinó la histología de las secciones. Los puntajes medios para degeneración/necrosis, inflamación endomisial, hemorragia e inflamación aponeurosis se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Inoculación	Degeneración/ Necrosis	Inflamación endomisial,	hemorragia	Inflamación aponeurosis
NaCl	0	0.5	0	0
Ply	3.6	3.8	3.0	1.4
GMBS-Ply	0.6	1.3	1.3	0.4
Adyuvante	2.9	3.9	2.8	2.8
Ply + Adyuvante	4.2	3.9	4.6	1.8
GMBS-Ply + ady.	2.9	3.9	3.8	1.6

Una comparación de puntajes histológicos para neumolaina nativa no adyuvada y destoxificada muestra que la GMBS es un reactivo de reticulación particularmente efectivo para usar para la destoxificación de neumolaina, produciendo un gran descenso en la degeneración/necrosis, inflamación endomielial, hemorragia e inflamación aponeurola.

La adición de adyuvante (50 ug de fosfato de aluminio y 5 ug de MPL) a las inoculaciones aumenta la cantidad de reactogenicidad como un efecto secundario de estimulación del sistema inmune. La destoxificación de neumolaina con GMBS permitió que el nivel de degeneración/necrosis redujera el producido por el adyuvante solo, que fue menor que el nivel producido mediante inoculación con neumolaina nativa.

La neumolaina destoxificada con GMBS produjo un nivel de hemorragia menor que el producido por la neumolaina nativa. Los niveles de inflamación endomielial fueron elevados por el adyuvante, y este nivel aún estaba presente en presencia de neumolaina nativa adyuvada o destoxificada con GMBS. Sin embargo, la inflamación aponeurola se redujo, del nivel producido por el adyuvante solo por la neumolaina nativa o destoxificada con GMBS, siendo el nivel de aponeurola ligeramente menor cuando la neumolaina había sido tratada con GMBS.

Experimento 5 - Evaluación de Toxicidad de neumolaina tratada con GMBS en ratones

Grupos de 20 ratones OF1 fueron sometidos intranasalmente con neumolaina nativa o neumolaina tratada con GMBS, y los ratones fueron monitoreados por los siguientes 9 días.

Como se muestra en la Figura 3, el sometimiento con 2 ug de neumolaina nativa condujo muy rápidamente a la muerte de todos los ratones en ese grupo. La neumolaina produjo lesiones a lo largo del sistema respiratorio que condujo a dificultades respiratorias y muerte. En contraste, la neumolaina tratada con GMBS había reducido substancialmente la toxicidad con todos los ratones inoculados con 2 ug, 5 ug o 10 ug de la neumolaina tratada con GMBS sobreviviendo el sometimiento.

Ejemplo 6 – estudios de protección usando neumolisina destoxificada

Los grupos de 20 ratones OF1 fueron inmunizados 3 veces intramuscularmente, en los días 0, 14 y 28 con 5 ug de neumolisina y 50 ug de fosfato de aluminio y 50 ug de MPL como adyuvante. Los ratones de control fueron inmunizados con adyuvante solo. La neumolisina fue no tratada o destoxificada usando el tratamiento de GMBS descrito anteriormente.

En el día 42, los ratones fueron administrados con un sometimiento intranasal letal con 2 ug de neumolisina nativa. Se monitoreó la supervivencia de los ratones los siguientes 9 días.

Resultados

El modelo de sometimiento letal condujo al 90% de mortalidad en ratones de control (Figura 4). La inmunización con neumolisina destoxificada con GMBS produjo muy buena protección con solamente 5% de ratones que murieron los siguientes 9 días. Esto fue comparable a la protección dada después de la inoculación con neumolisina nativa, seguida de la cual el 10% de ratones murieron.

Ejemplo 7 Evaluación de neumolisina destoxificada en combinación con PhtD en un modelo de sometimiento letal de ratón

Grupos de 20 ratones OF1 fueron inmunizados intramuscularmente con a) adyuvante solo o b) 1 ug de PhtD y adyuvante, o c) 1 ug de PhtD y 5 ug de neumolisina destoxificada con GMBS y adyuvante. El adyuvante usado estaba compuesto de 50 ug de fosfato de aluminio y 5 ug de MPL, y las inmunizaciones tomaron lugar en el día 0 y día 14. Los ratones fueron sometidos con una dosis letal intranasal de $5 \cdot 10^8$ CFU de cepa D39 de *S. pneumoniae* serotipo 2, y se monitoreó la supervivencia durante los siguientes 10 días.

Resultados

Como se muestra en la Figura 5, el sometimiento con cepa D39 condujo a letalidad del 75% después de 10 días en los ratones de control. La inmunización con PhtD sola no produjo protección significativa con el 70% de ratones en este grupo, que murieron después de 10 días ($p=0.29$). La inmunización con PhtD junto con neumolisina destoxificada con GMBS produjo protección significativamente mejor, con letalidad reducida al 50% ($p=0.04$).

Ejemplo 8 Destoxificación de neumolisina usando formaldehído

Un patrón de neumolisina purificada a una concentración de aproximadamente 0.4 mg/ml estaba en un amortiguador de fosfato de potasio 25 mM pH 7.0, se trató con L-leína 50 mM y 0.1% de formaldehído (p/v) por 21 días a 40°C.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para purificación de una citolisina bacteriana, que comprende los pasos de:

- a) cultivar un cultivo de células que expresan citolisina bacteriana;
- b) preparar un extracto a partir del cultivo que contiene citolisina bacteriana;
- c) enlazar la citolisina bacteriana de agregado soluble contenida en el extracto, en presencia de detergente, a un material de cromatografía de interacción hidrofóbico, bajo condiciones de sal alta (preferiblemente sal 0.6-2 M);
- d) eluir la citolisina bacteriana en presencia de detergente bajo condiciones de sal baja (preferiblemente sal 0-0.2M).

2. El proceso de la reivindicación 1, que además comprende los pasos de:

- e) remover el detergente de la citolisina bacteriana
- f) solubilizar la citolisina bacteriana mediante la adición de un deenaturalizante.
- g) remover el deenaturalizante de la citolisina bacteriana.

3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde la citolisina bacteriana es neumolisina neumocócica.

4. El proceso de las reivindicaciones 1-3, en donde el paso b) involucra el rompimiento mecánico de las células.

5. El proceso de las reivindicaciones 1-4, en donde el paso b) involucra el tratamiento con detergente.

6. El proceso de las reivindicaciones 1-5, en donde el mismo detergente está presente en los pasos c) y d).

7. El proceso de la reivindicación 5, en donde el mismo detergente está presente en los pasos b), c) y d).

8. El proceso de las reivindicaciones 1-7, en donde el detergente está presente en una concentración entre 0.1 y 5% (p/v).
9. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el paso b) involucra la centrifugación de material de célula deteriorado y recolección de un sobrenadante como el extracto del paso c).
10. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el material de cromatografía de interacción hidrofóbico usado en el paso c) contiene grupos aromáticos.
11. El proceso de la reivindicación 10, en donde el material de cromatografía hidrofóbico es fenil-esférico.
12. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el detergente presente en la solución usada en el paso c) y/o paso d) es un detergente anfipático.
13. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el detergente es lauroil sarcosinato de sodio.
14. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las condiciones de sal alta del paso c) contienen sal entre 0.6 M y 2M.
15. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde la solución usada en el paso c) y/o d) contiene una sal seleccionada del grupo consistente de cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, fosfato de amonio.
16. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las condiciones usadas en el paso c) y/o paso d) están entre pH 6-8, preferiblemente alrededor de pH 7.
17. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las condiciones usadas en el paso d) contienen sal 0-0.1 M.

18. El proceso de la reivindicación 17, en donde las condiciones usadas en el paso d) contienen sal 0-40 mM.

19. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el paso e) involucra la remoción de detergente mediante diafiltración o diálisis.

20. El proceso de la reivindicación 19, en donde la diafiltración/diálisis es contra un amortiguador bajo en sal de pH 8-10, preferiblemente alrededor de pH 9.

21. El proceso de las reivindicaciones 2-20, en donde el paso f) involucra la desnaturalización de citolisina bacteriana mediante la adición de un desnaturalizante, y el paso g) involucra el repliegue de la citolisina bacteriana mediante la remoción gradual del desnaturalizante.

22. El proceso de las reivindicaciones 2-21, en donde el desnaturalizante usado en el paso f) es clorhidrato de guanidina.

23. El proceso de la reivindicación 22, en donde se usa clorhidrato de guanidina 5-8 M.

24. El proceso de la reivindicación 22 o 23, en donde la citolisina bacteriana es contactada con urea 5-9 M durante el paso f).

25. El proceso de la reivindicación 24, en donde el paso f) involucra contactar la citolisina bacteriana con clorhidrato de guanidina 5-8 M, seguido del intercambio del clorhidrato de guanidina por urea 5-9M.

26. El proceso de las reivindicaciones 21-25, en donde un agente reductor está presente durante al menos parte de los pasos f) y g).

27. El proceso de la reivindicación 26, en donde el agente reductor es DTT 0.1-10 mM, preferiblemente DTT alrededor de 1 mM.

28. El proceso de la reivindicación 2-27, en donde el paso g) involucra la remoción del desnaturalizante mediante diafiltración o diálisis.

29. El proceso de la reivindicación 28, en donde la diafiltración o diálisis es contra una solución de pH 7-9.

30. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende un paso adicional de detoxificación de la citolisina bacteriana mediante tratamiento químico con un reactivo de reticulación.

31. El proceso de la reivindicación 30, en donde el tratamiento químico involucra el uso de un agente de reticulación que es reactivo con grupos amina y sulfhidrilo.

32. El proceso de la reivindicación 30, en donde el reactivo de reticulación contiene uno o más químicos seleccionados del grupo consistente de formaldehído, glutaraldehído, N-hidroxysuccinimido ésteres y GMBS.

33. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende un paso adicional de conjugar la citolisina bacteriana a un polisacárido capsular bacteriano.

34. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende un paso adicional de formular la citolisina bacteriana en una composición de vacuna con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35. El proceso de la reivindicación 34, en donde la citolisina bacteriana es formulada con proteína A enlazante de colina, o un fragmento inmunológico de esta.

36. El proceso de la reivindicación 34 o 35, en donde la citolisina bacteriana es formulada con uno o más de PhtA, PhtB, PhtD o PhtE, o un fragmento inmunogénico de estas.

37. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 34-36, en donde la citolisina bacteriana es formulada con un antígeno de *Haemophilus influenzae* no clasificable (NIH).

38. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 34-37, en donde la citolisina bacteriana es formulada con un antígeno de *Moraxella catarrhalis*.

39. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 34-38, en donde la citolisina bacteriana es formulada con un antígeno de RSV.

40. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 34-39, en donde la citolisina bacteriana es formulada con un antígeno del virus de parainfluenza.

41. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 34-40, en donde la citolisina bacteriana es formulada con un antígeno del virus de influenza.

42. Un proceso para la detoxificación de una toxina bacteriana que comprende tratar una toxina con un compuesto químico que es reactivo con grupos amina primaria, en donde más del 50% de la toxina retiene un peso molecular entre el 20% de su peso molecular original después del tratamiento, como se evaluó mediante SDS-PAGE.

43. Una citolisina bacteriana purificada mediante el método de la reivindicación 31.

44. La citolisina bacteriana de la reivindicación 43, en donde la citolisina bacteriana es neumolisina.

45. La citolisina bacteriana de la reivindicación 43 o 44, que está conjugada a un polisacárido bacteriano para formar conjugado citolisina bacteriana-polisacárido bacteriano o un conjugado neumolisina-polisacárido.

46. Una composición inmunogénica que comprende neumolisina o conjugado neumolisina-polisacárido de la reivindicación 44 o 45.

47. La composición inmunogénica de la reivindicación 46, que además comprende proteína A enlazante de colina, o un fragmento inmunogénico de esta.

48. La composición inmunogénica de la reivindicación 46 o 47, que además comprende uno o más de PhtA, PhtB, PhtD o PhtE, o un fragmento inmunogénico de estas.

49. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 46-48, que además comprende un antígeno de *Haemophilus influenzae* no clasificable (Nthi).

50. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 46-49, que además comprende un antígeno de *Moraxella catarrhalis*.

51. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 46-50, que además comprende un antígeno de RSV.

52. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 46-51, que además comprende un antígeno del virus de parainfluenza.

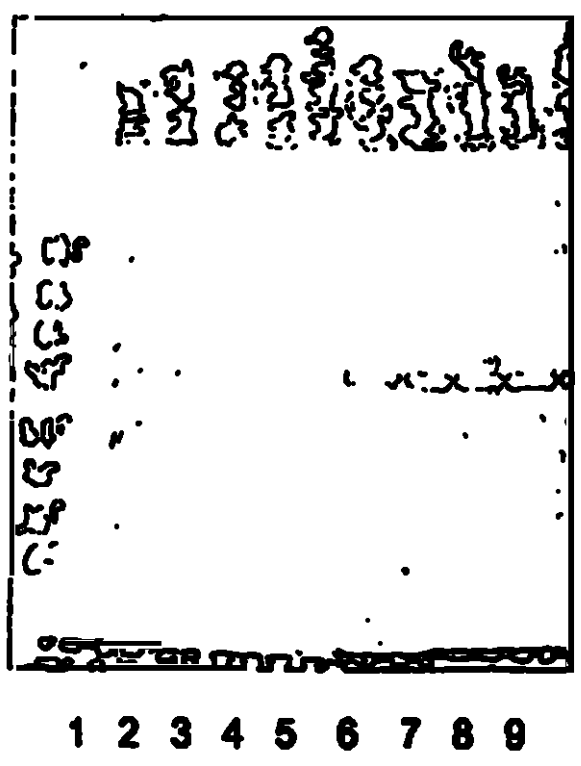
53. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 46-52, que además comprende un antígeno del virus de influenza.

54. Una vacuna que comprende neumoleína o conjugado de neumoleína-polisacárido de la reivindicación 44 o 45, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de las reivindicaciones 46-53, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

A



B

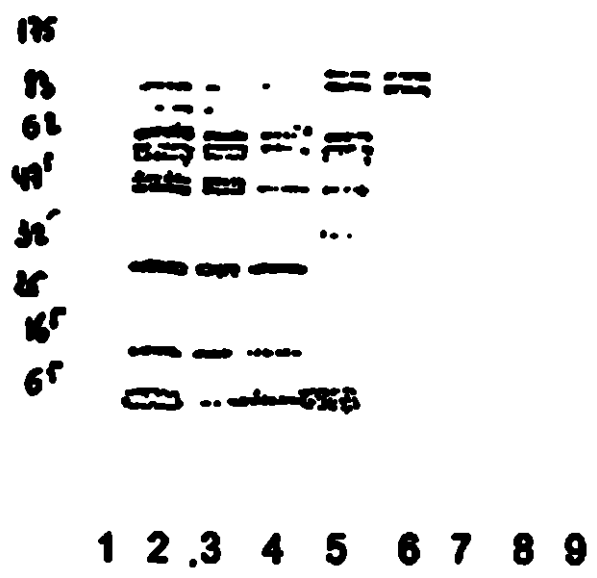
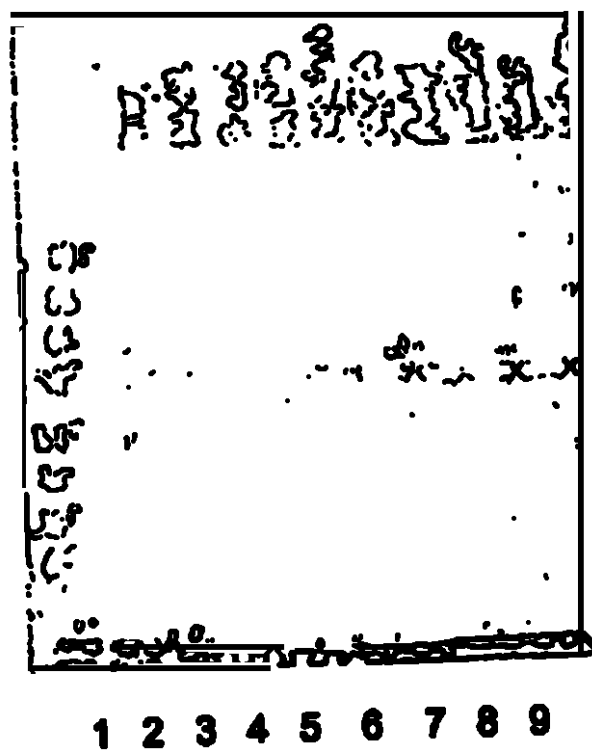
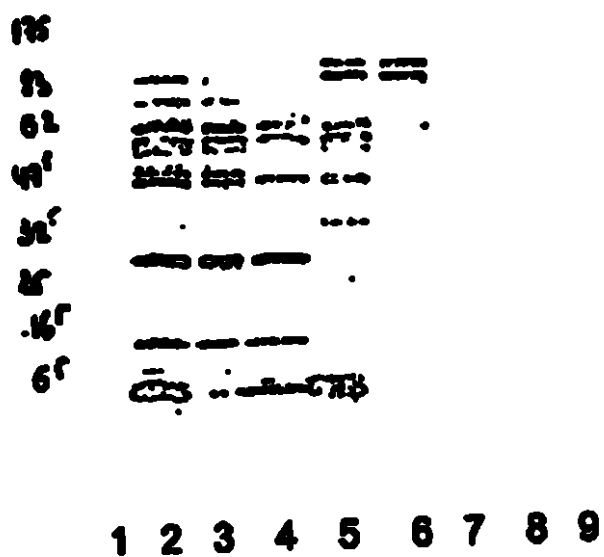


Figura 1

A



B



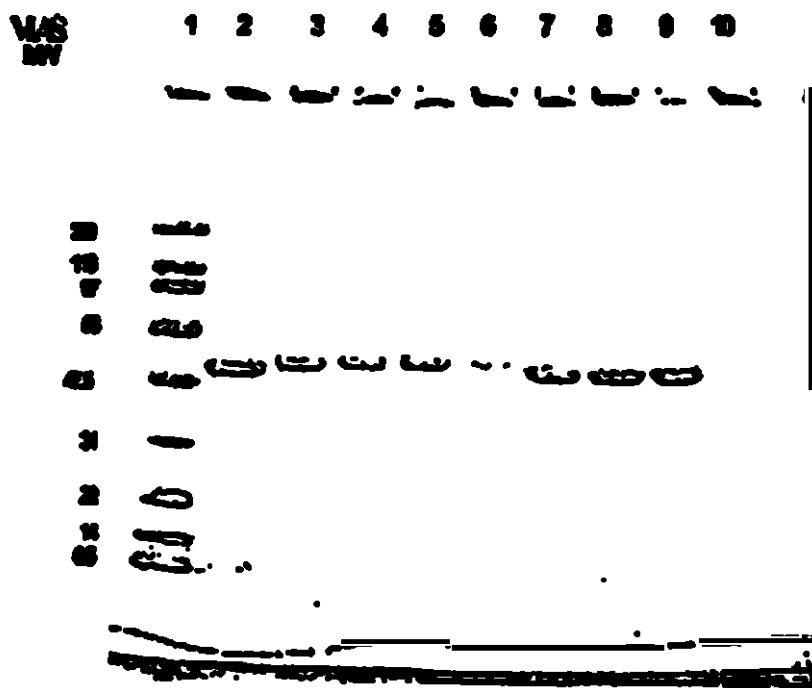


Figure 2

///

Figura 3

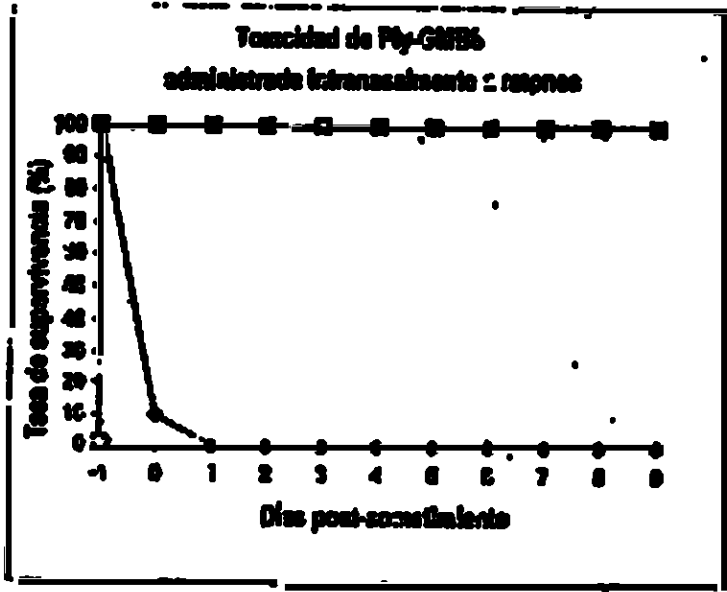


Figura 4

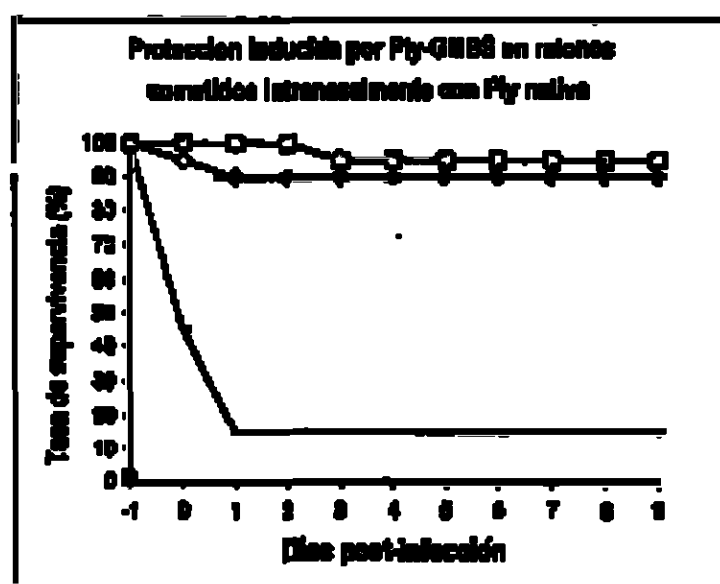
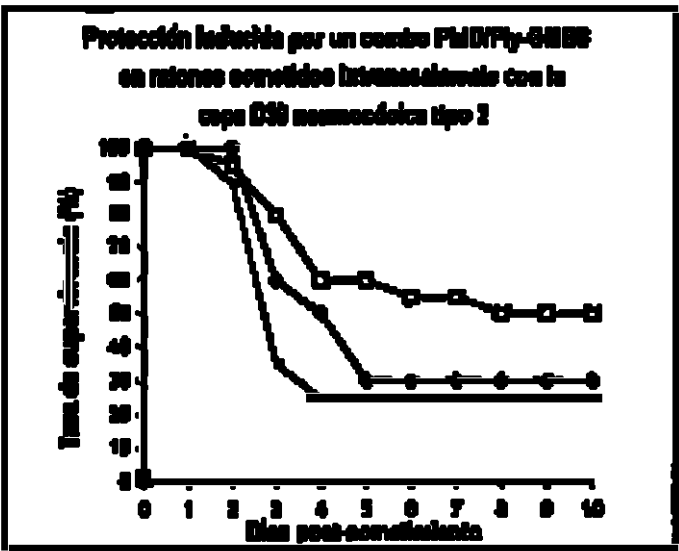


Figure 5

Efecto protector de neuroleptina derivada con GABA y Flud en un modelo de convulsión de ratón




Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 06 40
Fax: 360 82 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

115 48

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)

~~LLAMAS~~ RICHARDE ALICIA

ApoDERADO(a) y/o Representante de
~~GRANOCITRUELLER~~ BIOLOGICAL S.A.

REFERENCIA

Radicación No.	5 30928
Solicitud internacional	EP2004/002641
Fecha inicio fase nacional	13/10/2003
Trámite	11
Evento	379
Actuación	430
Oficio No.	9933

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 (TCP), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

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

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

Notifíquese al presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALEX CASANAVA CRESPO DE VERGEL

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
Fecha 23 de oct. 2020
adpel