



**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**

SOLICITUD  
**PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE N°

**06- 117698**

54. TÍTULO "VACUNAS CON ADYUVANTE QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA SHIGA"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/00

71. SOLICITANTE GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

DOMICILIO RIXENSART, BELGICA

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

22. BOGOTÁ, D.C. 21 NOV 2006

# PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
Rad: 06-117696-00000-0000  
Fee: 2006-11-21 18:18:28 Dep. 2020 NUECREACIONES  
Tra. 11 PATENTEYII  
Evs: 378 FASENACIONALI  
Act 411 PRESENTACION Folios: 135

## FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21-DIC-06

①

### SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

### SOLICITANTE (71)

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

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

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart,  
Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica.

Teléfono: 3284270 Fax: 6089701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

### IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐  
C.E. ☐ Otro ☐

Cual \_\_\_\_\_

Número \_\_\_\_\_

③

### REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

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

Teléfono: 3284270 Fax: 6089701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐  
C.E. ☐ Otro ☐

Cual \_\_\_\_\_

Número 39.890.713 TP 53.215

④

### INVENTOR(ES) (72)

Nombre: CHOMEZ, Patrick; COLLIGNON, Catherine, Pascaline, Anne, Ghislaine y  
VAN MECHELEN, Marcelle, Paulette.

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

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.

⑤

### PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2005/005555

Fecha: 19/05/05

Publicación Internacional No. WO 2005/112891 A3

Fecha: 01/12/05

⑥

### Título (54)

**"VACUNAS CON ADYUVANTE QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD B DE LA  
TOXINA SHIGA"**

⑦

### Clasificación Internacional (51) A61K 39/00

⑧

### Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

21/05/04

(31) Número de Solicitud

0411411.2

⑨

Comprobante de Pago No. 06-88.780

Fecha: 17 de Noviembre de 2006

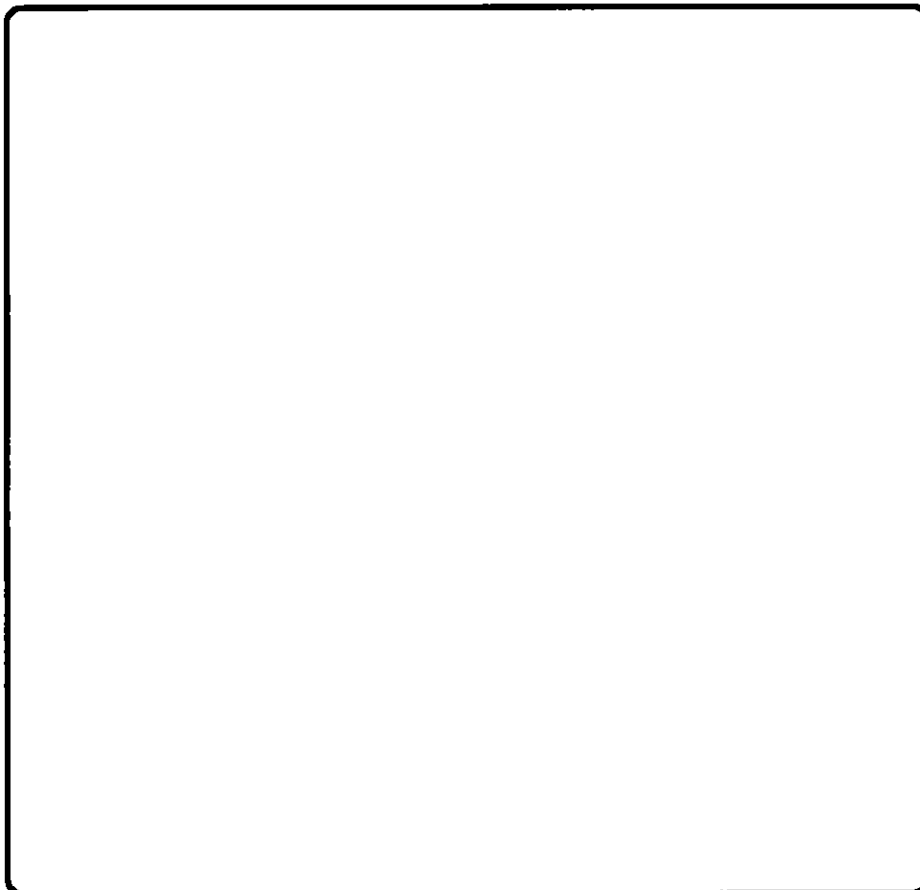
10

ANEXOS

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

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C. 39.690.713 T.P. 53.213

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
Rad: 06-117698-00000-0000  
Fee: 2008-11-21 16:18:28 Dep. 2020 NUE  
Tra. 11 PATENTEIYH  
Evo: 378 FASENACIONALI  
Act 411 PRESENTACION  
Folios: 138

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 68,780  
FECHA : NOVIEMBRE 17 DE 2006

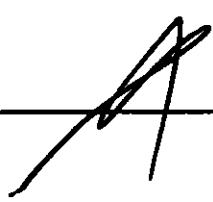
\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE        | TIPO PASO    | BANCO         | CUENTA      | No. PASO | FECHA PASO | Vr. PASO     |
|--------------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|--------------|
| LLOREDA Y CIA S. A | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 55643021 | 17/11/2006 | 4,837,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO    | TOTAL CONCEPTO                    |
|-------|-------------|-------------|-----------------------------------|
| 1     | 50005-01-01 | SOLICITUDES |                                   |
|       |             | 1           | TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN |
|       |             |             | TOTAL : \$ 463,000.00             |

CUATROCIENTOS SESENTA 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 está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida. .

  
ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

A.

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

---

**PODER**

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

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

Notarización, documento escrito en español.

**APOSTILLA**

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

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

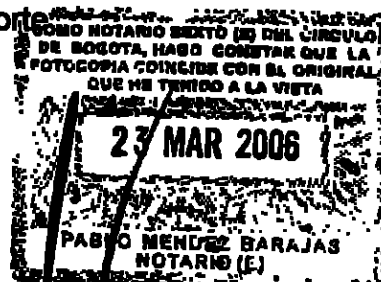
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Este documento público

2. ha sido firmado James Kerr Milligan  
3. actuando como Notario Público  
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

**CERTIFICADO**

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



TRADUCTOR OFICIAL  
RESOLUCION 2177

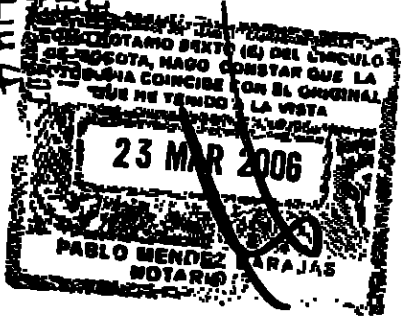
  
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE  
RELACIONES EXTERIORES

260567

Anita Esobal

NOTARIO DENTRO DEL  
CIRCULO  
NOTA, HAGO CONSTAR QUE LA  
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL  
QUE HE TENIDO A LA VISTA



NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

ues

JEFE DE LEGALIZACIONES  
GUAYAMA D.C.

Sello de la Oficina de Asuntos  
Exteriores y del Commonwealth

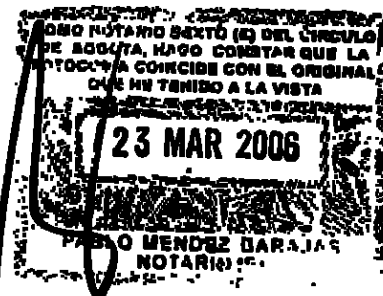
W. Glass  
Por el Secretario de Estado

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

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

TRADUCTOR OFICIAL  
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo  
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



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

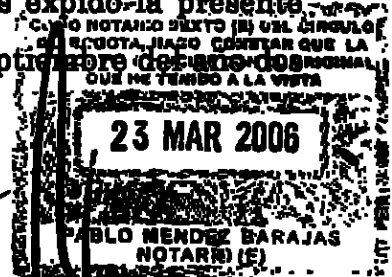
**C E R T I F I C O:**

**QUE** es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada "**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**" (anteriormente denominada "**Smithkline Beecham Biologicals s.a.**"), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1380 Rixensart, Bélgica;

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

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

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



**JAMES KERR MILLIGAN**  
Notario Público de Londres, Inglaterra



**APOSTILLE**

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

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

This public document/Le présent acte public

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

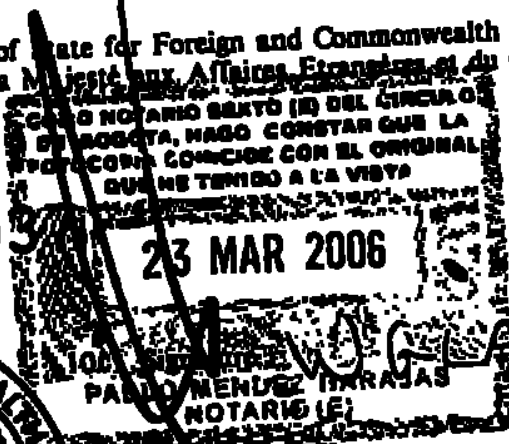
Certified/Attesté

5. at London/à Londres  
6. the/le ..... **23 MAR 2006** .....  
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 Étrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No

**G 74903**

9. Stamp:  
timbre:



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

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

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

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

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

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

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

Dado y firmado

The undersigned, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

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

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

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

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

Given and signed this

*Marcus Jonathan William DALTON*  
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

31 MAR 2006  
PABLO MENDEZ BARRA  
NOTARIO (I)

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es

de GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A., la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Bélgica, domiciliada en la ciudad de Rixensart, Bélgica, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de

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

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en

con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

On this day of , 200 , personally came

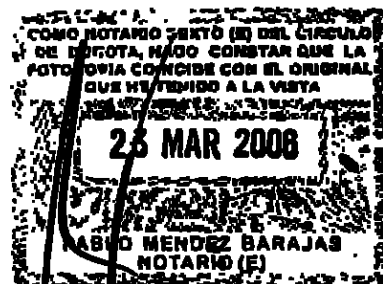
to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing Instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

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

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

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

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



folios 11 y 12  
Tajetis Tomatras.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <div><b>Industria y Comercio</b><br/><b>SUPERINTENDENCIA</b></div> <div><b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br/><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br/><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br/><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</b></div> |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
| <div>(21) N° de solicitud: 06 - 117648</div> <div>(22) Fecha de solicitud: 21-11-06</div> <div>(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País</div> <div>0411411.2 21-05-04 GB</div>                                                                                                                                                  |  | <div>(51) Int Cl: A61K 39/00</div> <div>(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.</div> <div>(72) Inventor(es): CHOMEZ, Patrick; COLLIGNON, Catherine, Pascaline, Anne, Ghislaine y VAN MECHELEN, Marcelle, Paulette.</div> <div>(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE</div> |  |
| <div>(85) Fecha limite inicio fase nacional: 21-12-06</div> <div>(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT</div> <div>Fecha de presentación de la solicitud: 19-05-05</div> <div>No. de solicitud: PCT/EP2005/005555</div>                                                                                                   |  | <div>(87) Publicación Internacional</div> <div>Fecha: 01-12-05</div> <div>N° publicación: WO 2005/112991 A3</div>                                                                                                                                                                          |  |
| <div>(54) Título: VACUNAS CON ADYUVANTE QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA SHIGA</div>                                                                                                                                                                                                                                                 |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1

Una composición para vacuna que contiene la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente inmunológicamente funcional de ella que es capaz de fijar el receptor Gb3, en formación de complejo con un antígeno, y además contiene un adyuvante, siempre que cuando el adyuvante sea solamente una sal metálica, esté formulado de tal manera que no más de aproximadamente 50% del antígeno sea adsorbido en la sal metálica, caracterizado porque el adyuvante se selecciona del grupo de sales metálicas, emulsiones de aceite en agua, agonistas del receptor tipo toll, QS21 o combinaciones de ellos.

# TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES

## PCT

### REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

|                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Registro de referencia del solicitante o agente<br><b>SAC/VB60873</b> | <b>PARA FUTURAS ACCIONES</b> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: small;"> <span>Ver Forma PCT/ISA/220</span> <span>así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.</span> </div>                                                                            |
| Solicitud internacional No.<br><b>PCT/EP2005/005555</b>               | <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;">           Fecha de registro internacional (día/mes/año)<br/> <b>19/05/2005</b> </div> <div style="width: 45%;">           Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año)<br/> <b>21/05/2004</b> </div> </div> |
| Solicitante<br><b>GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA</b>                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

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

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 8 hojas.

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

#### 1. Bases del reporte

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

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

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Casilla No. I.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla II).

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

#### 4. Respecto al título,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

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

**VACUNAS CON ADYUVANTE QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA SHIGA**

#### 5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Regla 38.2(b), según aparece en la Casilla No. IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

#### 6. Respecto a los dibujos,

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

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☒ ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

# REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2005/005555

Casilla No. I Secuencia(s) de ácido nucleótido y/o aminoácido (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Con respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia de aminoácido revelados en la solicitud internacional y necesarios para la invención reivindicada, la búsqueda internacional se realizó sobre la base de:
  - a. tipo de material
    - ☒ un listado de secuencias
    - ☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencia
  - b. formato del material
    - ☒ en formato escrito
    - ☒ en una forma legible para computadora
  - c. momento de presentación/suministro
    - ☐ contenido en la solicitud internacional tal como se presentó
    - ☐ presentado junto con la solicitud internacional en forma legible para computadora
    - ☒ suministrado subsecuentemente a esta Autoridad para el propósito de la búsqueda
2. ☒ Adicionalmente, en el caso de que más de una versión o copia de un listado de secuencias y/o tabla en relación con aquello haya sido presentada o suministrada, o se suministraron, tal como es apropiado, las afirmaciones requeridas de que la información en las copias subsecuentes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud tal como se presentó o no va más allá de la solicitud tal como se presentó.
3. Comentarios adicionales:

**REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2005/005555

13

**Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Ítem 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 Nos.:

porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber: Aunque las reivindicaciones 19, 20 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.

2. ☒ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:  
ver INFORMACIÓN ADICIONAL hoja PCT/ISA/210

3. ☐ Reivindicaciones Nos.:

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

**Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Ítem 3 de la primera hoja)**

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

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.

2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.

3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:

4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

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

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

15

**INFORMACIÓN ADICIONAL CONTINUACIÓN DE PCT/ISA/210****Continuación de la Casilla II.1**

Aunque las reivindicaciones 19, 20 están dirigidas a un método de tratamiento de un organismo humano o animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo con base en los efectos del compuesto/composición alegados.

**Continuación de la Casilla II.2**

Las reivindicaciones 1, 5-21 son poco claras a la luz del Artículo 6 del PCT. Las reivindicaciones intentan definir la materia objeto en términos de una propiedad deseada, i.e. el equivalente inmunológicamente funcional de STxB (subunidad B de la toxina Shiga). Aunque estas características funcionales pueden evaluarse con los métodos revelados en la presente solicitud, la persona versada en la materia no puede entender la definición de la materia objeto reivindicada, porque los compuestos reivindicados no están limitados por ninguna definición estructural y por lo tanto no existe un límite del número de compuestos para los que se pueda evaluar la actividad moduladora. La reivindicación no provee ningún criterio para discriminar entre compuestos nuevos y conocidos. Por lo tanto, es tal la falta de claridad, que no puede llevarse a cabo una búsqueda significativa sobre todo el alcance de dichas reivindicaciones.

Por consiguiente, la búsqueda y el examen se han llevado a cabo para aquellas partes de las reivindicaciones que parecen ser claras a la luz de la descripción, es decir, aquellas partes relacionadas con la subunidad B de STxB, VT1B, VT2B (c.f. p 4, 1) así como las toxinas tipo Shiga capaces de unirse al Gb3R (CD77R) teniendo al menos el 50 % de la secuencia identidad de aminoácidos para la subunidad B de la toxina Shiga (c.f. reivindicación 1, 2).

Se dirige la atención del solicitante al hecho de que las reivindicaciones relacionadas con invenciones respecto a las cuales no se ha establecido un reporte internacional de búsqueda, no necesitan ser el objeto de un examen internacional preliminar (Regla 66.1(e) del PCT). Se advierte al solicitante que la política de la EPO cuando actúa como una Autoridad Internacional de Examen Preliminar, es normalmente no realizar un examen preliminar sobre materia para la cual no se ha realizado ninguna búsqueda. Este es el caso, independientemente de si las reivindicaciones son o no modificadas tras la recepción del reporte de búsqueda o durante cualquier procedimiento del Capítulo II. Si la solicitud entra en la fase regional ante la EPO, se le recuerda al solicitante que debe llevarse a cabo una búsqueda durante el examen ante la EPO (ver norma C-VI, 8.5 de la EPO), para superar los problemas que llevaron a la declaración del Artículo 17(2).

## REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

**Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2005/005555**

15

**A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO**  
**A61K39/00 A61K39/39**

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

## IL CAMPOS BUSCADOS

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

**A61K**

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

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

**EPO-Internacional, PAJ, BIOSIS, WPI Dato**

### C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría * | Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes                                                                | Relevante a la reivindicación No. |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| X           | US 2002/012658 A1 (WILLIAMS JAMES A Y COL)<br>31 de Enero de 2002 (2002-01-31)<br><br>el documento completo<br>-----                                | 1, 2, 4, 5,<br>7, 9,<br>16-21     |
| X           | US 2004/013681 A1 (GREEN ALLAN M)<br>22 de Enero de 2004 (2004-01-22)<br>el documento completo<br>reivindicaciones 1-12<br>-----                    | 1-4,<br>16-21                     |
| X           | US 2002/081307 A1 (GREEN ALLAN M)<br>27 de Junio de 2002 (2002-06-27)<br>reivindicaciones 1-12<br>el documento completo<br>-----<br><br>-----<br>-- | 1-4,<br>16-21                     |

☒ En el recuadro C se enumeraron más documentos.

<sup>a</sup> Categorías especiales de documentos citados:

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

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

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

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

**\*P\* documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada**

**Fecha de la terminación real de la bilquera internacional**

**23 de Enero de 2006**

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

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

**T** documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención.

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

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

**'&' documento miembro de la misma familia de patentes**

**Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional**

02/02/2006

**Funcionario autorizado**

Lechner, O

17

# REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2005/005555

16

## C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría * | Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Relevante a la reivindicación No. |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| A           | <p> NACILLA HAICHEUR Y COL: "La subunidad B de la toxina Shiga, fusionada a un antígeno tumor elicit CTL y direcciona a las células dendríticas para permitir la presentación de péptidos MHC clase I-restringida, derivadas de antígenos exógenos"<br/> JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US,<br/> vol. 165, Septiembre de 2000 (2000-09)<br/> páginas 3301-3308, XP002187748<br/> ISSN: 0022-1767<br/> citado en la solicitud<br/> resumen </p> | 1-21                              |
| A           | <p> HAICHEUR NACILLA Y COL: "La subunidad B de la toxina Shiga acoplada a proteínas antigénicas de gran tamaño, elicit las respuestas inmunes humoral y mediada por células, asociadas a la polarización Th1-dominante"<br/> INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, OCT 2003,<br/> vol. 15, no. 10, Octubre de 2003 (2003-10),<br/> páginas 1161-1171, XP002353584<br/> ISSN: 0953-8178<br/> citado en la solicitud<br/> el documento completo </p>                                         | 1-21                              |
| A           | <p> ROSS PÁDRAIG J Y COL: "La toxina adenilato ciclasa de Bordetella pertussis actúa en sinergia con lipopolisacárido para promover la producción innata de interleucina-10 y potencia la inducción de Th2 y células T regulatorias"<br/> INFECTION AND IMMUNITY, MAR 2004,<br/> vol. 72, no. 3, Marzo de 2004 (2004-03),<br/> páginas 1568-1579, XP002353585<br/> ISSN: 0019-9567<br/> resumen </p>                                                                           | 1-21                              |
| A           | <p> SMITH DANIEL C Y COL: "Tiquete en primera clase a la clase I: proteínas toxinas como exploradoras para la presentación de antígenos"<br/> TRAFFIC (COPENHAGEN, DENMARK) OCT 2002,<br/> vol. 3, no. 10, Octubre de 2002 (2002-10),<br/> páginas 697-704, XP009056875<br/> ISSN: 1398-9219<br/> el documento completo </p>                                                                                                                                                   | 1-21                              |
| A           | <p> WO 02/060937 A (INSTITUT CURIE; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE; INSTITUT)<br/> 8 de Agosto de 2002 (2002-08-08)<br/> citado en la solicitud<br/> resumen </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 1-21                              |

-/-

18

# REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2005/005555

17

## C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría * | Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes                                                                                                                                                                                                                                              | Relevante a la reivindicación No. |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| A           | <p> SUCKOW MARK A Y COL: "Estimulación del anticuerpo gastrointestinal a la toxina Shiga por inmunización orogástrica en ratones"<br/> IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY,<br/> vol. 72, no. 1, 1994, páginas 69-74,<br/> XP009056873<br/> ISSN: 0818-9641<br/> el documento completo </p>                                               | 1-21                              |
| A           | <p> IMAI YASUYUKI Y COL: "Producción de inmunoglobulina A secretoria contra las subunidades enlazantes de la toxina Shiga en ratones por inmunización mucosa"<br/> INFECTION AND IMMUNITY,<br/> vol. 72, no. 2, Febrero de 2004 (2004-02),<br/> páginas 889-895, XP002353586<br/> ISSN: 0019-9567<br/> el documento completo </p> | 1-21                              |
| A           | <p> MORON G Y COL: "Nuevas herramientas para la entrega de antígenos a la vía de MHC clase I"<br/> TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US,<br/> vol. 25, no. 2, Febrero de 2004 (2004-02),<br/> páginas 92-97, XP004487053<br/> ISSN: 1471-4906<br/> el documento completo </p>                                           | 1-21                              |

19

**REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**  
 Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.  
 PCT/EP2005/005555

| Documento de patente citado en el reporte de búsqueda | Fecha de publicación | Miembro(s) de la familia de patentes |            |    | Fecha de publicación |
|-------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------|------------|----|----------------------|
| US 2002012658 A1                                      | 31-01-2002           | NINGUNO                              |            |    |                      |
| US 2004013681 A1                                      | 22-01-2004           | US                                   | 2002081307 | A1 | 27-06-2002           |
| US 2002081307 A1                                      | 27-06-2002           | US                                   | 2004013681 | A1 | 22-01-2004           |
| WO 02060937 A                                         | 08-08-2002           | CA                                   | 2435712    | A1 | 08-08-2002           |
|                                                       |                      | EP                                   | 1229045    | A1 | 07-08-2002           |
|                                                       |                      | JP                                   | 2004531230 | T  | 14-10-2004           |
|                                                       |                      | US                                   | 2004110935 | A1 | 10-06-2004           |

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                             |                                                                                                  |                                                                |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br><b>SAC/VB60873</b> | <b>FOR FURTHER ACTION</b><br>see Form PCT/ISA/220<br>as well as, where applicable, item 5 below. |                                                                |
| International application No.<br><b>PCT/EP2005/005555</b>   | International filing date (day/month/year)<br><b>19/05/2005</b>                                  | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br><b>21/05/2004</b> |
| Applicant<br><br><b>GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA</b>      |                                                                                                  |                                                                |

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

This International Search Report consists of a total of 8 sheets.

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

**1. Basis of the report**

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

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

b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

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

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

**4. With regard to the title,**

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

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

**ADJUVANTED SHIGA TOXIN B-SUBUNIT BASED VACCINES**

**5. With regard to the abstract,**

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this 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 this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

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

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

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/005555

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - a. type of material
    - ☒ a sequence listing
    - ☐ table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material
    - ☒ in written format
    - ☒ in computer readable form
  - c. time of filing/furnishing
    - ☐ contained in the international application as filed
    - ☐ filed together with the international application in computer readable form
    - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2005/005555

## 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 Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although claims 19, 20 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

**Continuation of Box II.1**

Although claims 19, 20 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

**Continuation of Box II.2**

Claims 1, 5-21 are unclear in the sense of Article 6, PCT. The claims attempt to define the subject-matter in terms of a desired property, i.e. immunologically functional equivalent of STxB (Shiga toxin B subunit). Although these functional features can be tested with the methods disclosed in the present application, the skilled person cannot understand the definition of the claimed subject-matter, because the claimed compounds are not limited by any structural definition and therefore no limits to the number of compounds to be tested for the modulating activity exist. The claim does not provide any criterion to discriminate between known and novel compounds. Thus, the lack of clarity is to such an extent that a meaningful search over the entire scope of said claims cannot be carried out. Consequently, the search and examination has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear in view of the description, namely those parts relating to the B-subunit of STxB, VT1B and VT2B (c.f. p 4, 1) as well as Shiga like toxins able of binding to the 6b3R (CD77R) having at least 50% amino acid sequence identity to the B-subunit of Shiga toxin (c.f. claim 1, 2).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

## INTERNATI NAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/005555

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/00 A61K39/39

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

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

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

EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                     | Relevant to claim No.     |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| X          | US 2002/012658 A1 (WILLIAMS JAMES A ET AL)<br>31 January 2002 (2002-01-31)<br><br>the whole document   | 1,2,4,5,<br>7,9,<br>16-21 |
| X          | US 2004/013681 A1 (GREEN ALLAN M)<br>22 January 2004 (2004-01-22)<br>the whole document<br>claims 1-12 | 1-4,<br>16-21             |
| X          | US 2002/081307 A1 (GREEN ALLAN M)<br>27 June 2002 (2002-06-27)<br>claims 1-12<br>the whole document    | 1-4,<br>16-21             |
|            | -/-                                                                                                    |                           |

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

## \* Special categories of cited documents:

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

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.  
"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 January 2006

Date of mailing of the international search report

02/02/2006

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 2016 Patentamt 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl,  
Fax: (+31-70) 340-2016

Authorized officer

Lechner, O

24

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                       |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
| A                                                    | <p>NACILLA HAICHEUR ET AL: "The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 165, September 2000 (2000-09), pages 3301-3308, XP002187748<br/>ISSN: 0022-1767<br/>cited in the application<br/>abstract</p> | 1-21                  |
| A                                                    | <p>HAICHEUR NACILLA ET AL: "The B subunit of Shiga toxin coupled to full-size antigenic protein elicits humoral and cell-mediated immune responses associated with a Th1-dominant polarization."</p> <p>INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, OCT 2003, vol. 15, no. 10, October 2003 (2003-10), pages 1161-1171, XP002353584<br/>ISSN: 0953-8178<br/>cited in the application<br/>the whole document</p>                                    | 1-21                  |
| A                                                    | <p>ROSS PÁDRAIG J ET AL: "Adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells."</p> <p>INFECTION AND IMMUNITY, MAR 2004, vol. 72, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 1568-1579, XP002353585<br/>ISSN: 0019-9567<br/>abstract</p>                                                           | 1-21                  |
| A                                                    | <p>SMITH DANIEL C ET AL: "1st class ticket to class I: protein toxins as pathfinders for antigen presentation."</p> <p>TRAFFIC (COPENHAGEN, DENMARK) OCT 2002, vol. 3, no. 10, October 2002 (2002-10), pages 697-704, XP009056875<br/>ISSN: 1398-9219<br/>the whole document</p>                                                                                                                                                 | 1-21                  |
| A                                                    | <p>WO 02/060937 A (INSTITUT CURIE; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE; INSTITUT) 8 August 2002 (2002-08-08)<br/>cited in the application<br/>abstract</p>                                                                                                                                                                                                                                                              | 1-21                  |
|                                                      | — / —                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                       |

5

26

25

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                            |                       |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                         | Relevant to claim No. |
| A                                                    | SUCKOW MARK A ET AL: "Stimulation of gastrointestinal antibody to Shiga toxin by orogastric immunization in mice" IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY, vol. 72, no. 1, 1994, pages 69-74, XP009056873<br>ISSN: 0818-9641<br>the whole document                                     | 1-21                  |
| A                                                    | IMAI YASUYUKI ET AL: "Production of secretory immunoglobulin A against Shiga toxin-binding subunits in mice by mucosal immunization." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 72, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 889-895, XP002353586<br>ISSN: 0019-9567<br>the whole document | 1-21                  |
| A                                                    | MORON G ET AL: "New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 25, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 92-97, XP004487053<br>ISSN: 1471-4906<br>the whole document                                      | 1-21                  |

27

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/005555

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|----------------------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| US 2002012658 A1                       | 31-01-2002       | NONE                    |                  |
| US 2004013681 A1                       | 22-01-2004       | US 2002081307 A1        | 27-06-2002       |
| US 2002081307 A1                       | 27-06-2002       | US 2004013681 A1        | 22-01-2004       |
| WO 02060937 A                          | 08-08-2002       | CA 2435712 A1           | 08-08-2002       |
|                                        |                  | EP 1229045 A1           | 07-08-2002       |
|                                        |                  | JP 2004531230 T         | 14-10-2004       |
|                                        |                  | US 2004110935 A1        | 10-06-2004       |

26

28

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

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual  
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional  
1 de Diciembre de 2005 (01.12.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2005/112991 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2005/005555

(22) Fecha de Registro Internacional:  
19 de Mayo de 2005 (19.05.2005)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:  
0411411.2 21 de Mayo de 2004 (21.05.2004) GB

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

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): CHOMEZ, Patrick [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals sa, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). COLLIGNON, Catherine, Pascale, Anne, Ghislaine [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals sa, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). VAN MECHELEN, Marcelle, Paulette [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals sa, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agente: CHIAPPINELLI, Susan, Ann; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property (CN925.1), 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).

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

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

— como derecho del solicitante para solicitar y que se le otorgue una patente (Regla 4.17(ii) para las siguientes designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— como derecho del solicitante para reivindicar la prioridad de la solicitud más temprana (Regla 4.17(iii) para las siguientes designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— del inventor (Regla 4.17(iv)) para Estados Unidos de América solamente

Publicado:

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

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional:  
30 de Marzo de 2006

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

(34) Título: VACUNAS

(57) Resumen: La presente invención proporciona una composición para vacuna que contiene la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente inmunológicamente funcional de ella que es capaz de fijar el receptor Gb3, que forma complejo con un antígeno, y que contiene además un adyuvante, siempre que cuando el adyuvante sea solamente una sal metálica esté formulado de tal forma que no más de aproximadamente 50% del antígeno sea adsorbido en la sal metálica. Estas composiciones proporcionan una respuesta inmunológica mejorada comparada con la de la toxina Shiga o con un equivalente inmunológicamente funcional de ella que forma complejo con un antígeno sin ningún adyuvante, o un antígeno solo con adyuvante.

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
1 December 2005 (01.12.2005)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2005/112991 A3(51) International Patent Classification:  
A61K 39/60 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)

SH, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) International Application Number:  
PCT/EP2005/005555

Declarations under Rule 4.17:

(22) International Filing Date: 19 May 2005 (19.05.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
0411411.2 21 May 2004 (21.05.2004) GB

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

(72) Inventors, and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CHOMEZ, Patrick [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals sa, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). COLLIGNON, Catherine, Pascaline, Anne, Ghislaine [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals sa, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). VAN MECHELEN, Marcelle, Paulette [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals sa, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agent: CHIAFFINELLI, Susana, Ann; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property (CN925.1), 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) 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, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GU, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GU, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for the following designations: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GU, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

Published:

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,

(86) Date of publication of the international search report:  
30 March 2006

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

(54) Title: VACCINES

(57) Abstract: The present invention provides a vaccine composition comprising the B subunit of Shiga toxin or an immunologically functional equivalent thereof which is able to bind the Gb3 receptor, complexed with an antigen, and further comprising an adjuvant, provided that when the adjuvant is solely a metal salt it is formulated in such a way that not more than about 50% of the antigen is adsorbed onto the metal salt. Such compositions provide an improved immune response compared to Shiga toxin or an immunologically functional equivalent thereof complexed with an antigen with no adjuvant, or an antigen alone with adjuvant.

WO 2005/112991 A3

**CAPÍTULO REIVINDICATORIO COMO FUE  
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE  
INTERNACIONAL JUNTO CON SU TRADUCCIÓN**

## REVINDICACIONES

1. Una composición para vacuna que contiene la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente inmunológicamente funcional de ella que es capaz de fijar el receptor Gb3, en formación de complejo con un antígeno, y además contiene un adyuvante, siempre que cuando el adyuvante sea solamente una sal metálica, esté formulado de tal manera que no más de aproximadamente 50% del antígeno sea adsorbido en la sal metálica.
2. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada además porque el equivalente inmunológicamente funcional de la subunidad B de la toxina Shiga tiene al menos 50% de identidad de secuencia de aminoácidos con la subunidad B de la toxina Shiga.
3. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada además porque el vector es la subunidad B de la toxina Shiga o un fragmento funcional de ella.
4. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada además porque el vector es la subunidad B de la Verotoxina 1 o un fragmento funcional de ella.
5. Una composición para vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4, caracterizada además porque el adyuvante se selecciona del grupo de sales metálicas, emulsiones de aceite en agua, agonistas del receptor tipo toll, saponinas o combinaciones de ellos.

6. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada además porque el adyuvante es un agonista del receptor de tipo toll.

5 7. Una composición para vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada además porque el antígeno y la subunidad B están unidos covalentemente.

8. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada además porque el antígeno está  
10 unido a la toxina por medio de un residuo de cisteína.

9. Una composición para vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada además porque el adyuvante se selecciona del grupo: sales metálicas, una saponina, lípido A o derivado de él, un fosfato de  
15 alquil glucosaminida, un oligonucleótido inmunoestimulador o combinaciones de ellos.

10. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada además porque la saponina es presentada en la forma de un liposoma, Iscom, o una emulsión de  
20 aceite en agua.

11. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 9 o con la reivindicación 10, caracterizada además porque la saponina es QS21.

12. Una composición para vacuna de acuerdo con la  
25 reivindicación 9, 10 u 11, caracterizada porque el derivado de lípido

A se selecciona de lípido A monofosforil, lípido A monofosforil 3 desacilado, OM 174, OM 197, OM 294.

13. Una composición para vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 12, caracterizada además porque el  
5 adyuvante es una combinación de al menos un representante de dos de los siguientes grupos:

- i) una saponina,
- ii) un agonista del receptor 4 de tipo toll, y
- iii) un agonista del receptor 9 de tipo toll.

10 14. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizada además porque la saponina es QS21 y el agonista del receptor 4 de tipo toll es lípido A monofosforil 3 desacilado, y el receptor 9 de tipo toll es un oligonucleótido Inmunoestimulador que contiene CpG.

15 15. Una composición para vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 14, caracterizada además porque el antígeno se selecciona del grupo de antígenos que proporciona Inmunidad contra el grupo de enfermedades seleccionadas de patógenos intracelulares o enfermedades proliferativas.

20 16. Una composición para vacuna que contiene la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente inmunológicamente funcional de ella, con un antígeno y un adyuvante para su uso en medicina.

25 17. Uso de la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente inmunológicamente funcional de ella y un antígeno y un adyuvante, para la fabricación de una vacuna para la prevención o

tratamiento de una enfermedad.

18. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, para el aumento de la respuesta de CD8 específica para un antígeno.

19. Un método para tratar o prevenir enfermedades, que  
5 comprende administrar a un paciente que sufre de una enfermedad o que es susceptible a sufrirla, una composición para vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 15.

20. Un método para aumentar una respuesta inmune de CD8 específica para un antígeno, que comprende la administración a un  
10 paciente de una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 15.

21. Un proceso para la producción de una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 15, caracterizado además porque un antígeno en combinación con la  
15 subunidad B de la toxina Shiga o con el equivalente inmunológicamente funcional de ella, está mezclado con un adyuvante.

34

## Claims:

1. A vaccine composition comprising the B subunit of Shiga toxin or an immunologically functional equivalent thereof which is able to bind the Gb3 receptor, complexed with an antigen, and further comprising an adjuvant, provided that when the adjuvant is solely a metal salt it is formulated in such a way that not more than about 50% of the antigen is adsorbed onto the metal salt.
2. A vaccine composition as claimed in claim 1 wherein the immunologically functional equivalent of the B subunit of Shiga toxin has at least 50% amino acid sequence identity to the B subunit of Shiga toxin.
3. A vaccine composition as claimed in claim 2, wherein the vector is the B subunit of Shiga toxin or a functional fragment thereof.
4. A vaccine composition as claimed in claim 2 wherein the vector is the B subunit of Verotoxin-1 or a functional fragment thereof.
5. A vaccine composition as claimed in any of claims 1 to 4 wherein the adjuvant is selected from the group of metal salts, oil in water emulsions, Toll like receptor agonists, saponins or combinations thereof.
6. A vaccine composition as claimed in claim 5 wherein the adjuvant is a Toll like receptor agonist.
7. A vaccine composition as claimed in any preceding claim, wherein the antigen and B sub unit are covalently attached.
8. A vaccine composition as claimed in claim 7 wherein the antigen is attached to the toxin via a cysteine residue.
9. A vaccine composition as claimed in any preceding claim wherein the adjuvant is selected from the group: metallic salts, a saponin, lipid A or derivative thereof, an alkyl glucosaminide phosphate, an immunostimulatory oligonucleotide or combinations thereof.
10. A vaccine composition as claimed in Claim 9 wherein the saponin is presented in the form of a liposome, Iscom, or an oil in water emulsion.
11. A vaccine composition as claimed in claim 9 or 10 wherein the saponin is QS21.
12. A vaccine composition as claimed in claim 9, 10 or 11 wherein the Lipid A derivative is selected from Monophosphoryl lipid A, 3 deacylated Monophosphoryl lipid A, OM 174, OM 197, OM 294.
13. A vaccine composition as claimed in any of claim 1 to 12 wherein the adjuvant is a combination of at least one representative from two of the following groups,
  - i) a saponin,
  - ii) a Toll - like receptor 4 agonist, and
  - iii) a Toll - Like receptor 9 agonist.

36

- 35
14. A vaccine composition as claimed in claim 13 wherein the saponin is QS21 and the toll like receptor 4 agonist is 3 deacylated monophosphoryl lipid A and the toll like receptor 9 is a CpG containing immunostimulatory oligonucleotide.
15. A vaccine composition as claimed in any one of claims 1 to 14 wherein the antigen is selected from the group of antigens that provide immunity against the group of diseases selected from, intracellular pathogens or proliferative diseases.
16. A vaccine composition comprising the B subunit of Shiga toxin or an immunologically functional equivalent thereof with an antigen and an adjuvant for use in medicine.
- 10 17. Use of the B subunit of a shiga toxin or an immunologically functional equivalent thereof and an antigen and an adjuvant for the manufacture of a vaccine for the prevention or treatment of disease.
18. The use as claimed in claim 17 for the raising of an antigen specific CD8 response.
- 15 19. A method of treating or preventing disease comprising administering to a patient suffering from or susceptible to disease a vaccine composition according to any one of claims 1 to 15
20. A method for raising an antigen specific CD 8 immune response comprising the administration to a patient of a vaccine according to any one of claims 1 to 15.
- 20 21. A process for the production of a vaccine according to any of claims 1 to 15 wherein an antigen in combination with the B subunit of shiga toxin or immunologically functional equivalent thereof is admixed with an adjuvant.

De la  
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para:

PCT

ver forma PCT/ISA/220

OPINIÓN ESCRITA DE LA  
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Regla 43bis.1)

Fecha de correo  
(día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)

Registro de referencia del solicitante o  
agente  
ver forma PCT/ISA/220

PARA FUTURAS ACCIONES  
Ver párrafo 2 a continuación

Solicitud Internacional No.

Fecha de registro internacional  
(día/mes/año)

Fecha de prioridad  
(día/mes/año)

PCT/EP2005/005555

19.05.2005

21.05.2004

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC  
A61K39/00, A61K39/39

Solicitante

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA

1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

- |                                     |                  |                                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Casilla No. I    | Bases de la opinión                                                                                                                                                                    |
| <input type="checkbox"/>            | Casilla No. II   | Prioridad                                                                                                                                                                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Casilla No. III  | No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial                                                                                           |
| <input type="checkbox"/>            | Casilla No. IV   | Falta de unidad de invención                                                                                                                                                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Casilla No. V    | Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación |
| <input type="checkbox"/>            | Casilla No. VI   | Ciertos documentos citados                                                                                                                                                             |
| <input type="checkbox"/>            | Casilla No. VII  | Ciertos defectos en la solicitud internacional                                                                                                                                         |
| <input type="checkbox"/>            | Casilla No. VIII | Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional                                                                                                                                 |

2. ACCIONES FUTURAS

Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional.

Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde.

Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220.

3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de correo de la ISA:  
Oficina Europea de Patentes  
D-80298 Munich  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Funcionario Autorizado  
  
Lechner, O  
Teléfono No. +49 89 2399-8687

37

Casilla No. I Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión se ha establecido según la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo bajo este ítem.  
☐ Esta opinión se ha establecido según una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el idioma de una traducción proporcionada para la búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1(b)).
2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:
  - a. tipo de material:  
☒ un listado de secuencia  
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
  - b. formato de material:  
☒ en formato escrito  
☒ en formato legible por computador
  - c. tiempo de presentación/suministro:  
☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.  
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.  
☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..
3. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.
4. Comentarios adicionales:

39

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

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un nivel inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,  
☒ reivindicaciones Nos. 1, 5-21 (todas en parte)

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 19-20 se refieren a la siguiente materia objeto la cual no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):  
ver hoja separada
- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*):
- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.
- ☒ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos. 1, 5-21 (todas en parte)
- ☐ El nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida no cumple con el estándar proporcionado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:
- |                                   |                                                    |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------|
| la forma escrita                  | <input type="checkbox"/> no se ha proporcionado    |
|                                   | <input type="checkbox"/> no cumple con el estándar |
| el formato legible por computador | <input type="checkbox"/> no se ha proporcionado    |
|                                   | <input type="checkbox"/> no cumple con el estándar |
- ☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver la hoja separada para más detalles

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración

|                               |                                                    |
|-------------------------------|----------------------------------------------------|
| Novedad (N)                   | Si: Reivindicaciones 6, 8, 10-15                   |
|                               | No: Reivindicaciones 1-5, 7, 9, 16-21              |
| Nivel Inventivo (IS)          | Si: Reivindicaciones                               |
|                               | No: Reivindicaciones 1-21                          |
| Aplicabilidad Industrial (IA) | Si: Reivindicaciones 1-18, 21 (c.f. hoja separada) |
|                               | No: Reivindicaciones                               |

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

### Ítem III

#### **1 No establecimiento de opinión con respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial (Regla 67.1 del PCT)**

Esta Autoridad considera que la materia objeto relacionada con las reivindicaciones 19, 20 está cubierta por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) del PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) del PCT).

#### **2 Problemas de claridad principales (Artículo 6 del PCT)**

**2.1 Las reivindicaciones 1, 5-21 son poco claras a la luz del Artículo 6 del PCT.** Las reivindicaciones intentan definir la materia objeto en términos de una propiedad deseada, i.e., equivalente inmunológicamente funcional de STxB (subunidad B de la toxina Shiga). Aunque esas características funcionales pueden evaluarse con los métodos revelados en la presente solicitud, la persona versada en la materia no puede entender la definición de la materia objeto reivindicada, porque los compuestos reclamados no están limitados por ninguna definición estructural y por lo tanto no existen límites para el número de compuestos para los que se pueda evaluar la actividad moduladora. La reivindicación no provee ningún criterio para discriminar entre compuestos nuevos y conocidos. Entonces, es tal la falta de claridad que no puede realizarse una búsqueda significativa sobre todo el alcance de las reivindicaciones mencionadas.

Por consiguiente, la búsqueda y el examen se han llevado a cabo para aquellas partes de las reivindicaciones que aparentemente son claras de acuerdo con la descripción, es decir aquellas partes relacionadas con la subunidad B de STxB, VT1B y VT2B (c.f.p.4 §1) así como las toxinas tipo Shiga capaces de unirse al Gb3R (CD77R) teniendo al menos el 50% de la secuencia identidad de aminoácidos para la subunidad B de la toxina Shiga (c.f. reivindicación 1,2).

### Ítem V

**3 Se hace referencia de los siguientes documentos:**

**D1 US 2002/012658 A1 (WILLIAMS JAMES A Y COLS) Enero 31 de 2002 (2002-01-31)**

**D2 US 2004/013681 A1 (GREEN ALLAN M) Enero 22 de 2004 (2004-01-22)**

**D3 US 2002/081307 A1 (GREEN ALLAN M) Junio 27 de 2002 (2002-06-27)**

**D4 WO 02/060937 A (INSTITUT CURIE; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE; INSTITUT) Agosto 8 de 2002 (2002-08-08)**

#### **4 Novedad (Artículo 33(2) del PCT)**

4.1 D1 revela una vacuna que comprende una proteína de fusión que comprende una secuencia de una proteína no toxina y al menos una porción de una toxina bacteriana, siendo dicha toxina bacteriana seleccionada de la verotoxina 1 de E.coli (VT1), VT2 y la toxina Shiga (reiv. 42). Específicamente, son utilizadas las subunidades-B de la toxina bacteriana (c.f. reiv. 42,43). El documento contempla adicionalmente la inmunización con o sin adyuvante, siendo el adyuvante p. ej., Quil-A o cualquier otro adyuvante que aumente la respuesta inmune (c.f. §170).

Por lo tanto, en vista de las enseñanzas de D1, la materia objeto de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 7, 9, 16-21 no puede considerarse novedosa a la luz del Artículo 33(2) del PCT.

4.2 D2 y D3, reivindican el uso de un conjugado de una toxina-Ag (solo o) en combinación con un adyuvante (reivindicaciones 1-7), siendo la toxina pref. STxB, VTxB o CTxB (reivindicación 12) en una vacuna (Fig.1, §11, §25, §26, §45, §46, §89).

Por lo tanto, en vista de las enseñanzas de D1, la materia objeto de las reivindicaciones 1-4, 16-21 no puede considerarse novedosa a la luz del Artículo 33(2) del PCT.

4.3 Se considera que la materia objeto de las reivindicaciones 6, 8, 10-15 es novedosa a la luz del Artículo 33(2), PCT.

**5. Nivel inventivo (Artículo 33(3) del PCT)**

La materia objeto de las reivindicaciones 6, 8, 10-15 parecería no involucrar nivel inventivo a la luz del Artículo 33(3) del PCT por las siguientes razones:

D2 (o D3) puede ser considerado como el documento del estado de la técnica más cercano y reclama el uso de un conjugado de una toxina-Ag solo o en combinación con un adyuvante (reivindicaciones 1-7), siendo la toxina pref. STxB, VTxB o CTxB (reivindicación 12) en una vacuna (Fig.1, §11, §25, §26, §45, §46, §89).

La materia objeto de las reivindicaciones 6, 10-15 difiere de D1 en que revela una composición de una vacuna que contiene un receptor Gb3 que se une al conjugado antígeno-toxina, administrado junto con diferentes adyuvantes como sales metálicas, emulsiones de aceite en agua, agonistas de receptores tipo Toll, etc.

Por lo tanto, el problema técnico es proveer adyuvantes específicos para una composición de una vacuna que comprende un receptor Gb3 que se une al conjugado antígeno-toxina.

La (las) solución(es) reivindicadas es/son los adyuvantes específicos listados en las reivindicaciones 6, 10-15.

Partiendo del documento del arte previo más cercano, D2 (o D3), podría parecer que para proveer un adyuvante adecuado para mejorar la respuesta inmune al constructo STxB-Ag no se necesitaran habilidades inventivas. La función de cualquier adyuvante ya es por definición, mejorar una reacción inmune dada.

Debido al hecho de que los constructos conjugados STxB-Ag acoplados por Cys son también conocidos en el arte previo, c.f.p.ej, D4 (describe un portador polipeptídico universal para direccionar directa o indirectamente a Gb3 y teniendo la fórmula STxB-Z(n)-Cys), la adición de coadyuvantes a dicho constructo específico tampoco requiere habilidades inventivas en vista del arte previo más cercano.

Por consiguiente, la materia objeto de las reivindicaciones 6, 8, 10-15 parecería no involucrar nivel inventivo a la luz del Artículo 33(3) del PCT.

#### **6 Otras observaciones**

- 6.1** En la última fase regional Europea las objeciones podrían ser realizadas contra cualquier expresión en la descripción tal como "...incorporado por referencia..." (p.ej., en p14. último §-p15, l2) pues la ley regional de patentes requiere que la solicitud se contenga a sí misma.
- 6.2** Contrario a los requisitos de la Regla 5.1 (a)(ii) del PCT, los antecedentes relevantes revelado en D1-D3 aparentemente no es discutido/mencionado en la descripción, ni los documentos son allí identificados (Lineamientos 4.05).

# PATENT COOPERATION TREATY

43

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

## WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing  
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference  
see form PCT/ISA/220

**FOR FURTHER ACTION**  
See paragraph 2 below

International application No.  
PCT/EP2005/005555

International filing date (day/month/year)  
19.05.2005

Priority date (day/month/year)  
21.05.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC  
A61K39/00, A61K39/39

Applicant  
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA

### 1. This opinion 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 Rule 43bis.1(a)(i) 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

### 2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 68.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

### 3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office  
D-80268 Munich  
Tel. +49 89 2369 - 0 Tlx 523696 epmu d  
Fax: +49 89 2369 - 4466

Authorized Officer

Lechner, O  
Telephone No. +49 89 2369-6667



45

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
PCT/EP2005/005555

44

---

**Box No. I Basis of the opinion**

---

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.  
☐ This opinion has been established on the basis of a translation 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)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
  - a. type of material:  
☒ a sequence listing  
☐ table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material:  
☒ in written format  
☒ in computer readable form
  - c. time of filing/furnishing:  
☐ contained in the international application as filed.  
☐ filed together with the international application in computer readable form.  
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

46

45

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

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

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 1, 5-21 (all in part)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 19, 20 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

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

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

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 1, 5-21 (all in part)

☐ 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

47

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

|                               |             |                           |
|-------------------------------|-------------|---------------------------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | 8, 8, 10-15               |
|                               | No: Claims  | 1-5,7,9,16-21             |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims |                           |
|                               | No: Claims  | 1-21                      |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | 1-18, 21 (c.f. sep sheet) |
|                               | No: Claims  |                           |

2. Citations and explanations

see separate sheet

**Item III**

**1 Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability (Rule 67.1, PCT)**

Claims 19, 20 relate to subject matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv), PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject matter of these claims (Article 34(4)(a)(i), PCT).

**2 Major Clarity problems (Article 6, PCT)**

**2.1** Claims 1, 5-21 are unclear in the sense of Article 6, PCT. The claims attempt to define the subject-matter in terms of a desired property, i.e. immunologically functional equivalent of STxB (Shiga toxin B subunit). Although these functional features can be tested with the methods disclosed in the present application, the skilled person cannot understand the definition of the claimed subject-matter, because the claimed compounds are not limited by any structural definition and therefore no limits to the number of compounds to be tested for the modulating activity exist. The claim does not provide any criterion to discriminate between known and novel compounds. Thus, the lack of clarity is to such an extent that a meaningful search over the entire scope of said claims cannot be carried out.

Consequently, the search and examination has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear in view of the description, namely those parts relating to the B-subunit of STxB, VT1B and VT2B (c.f. p 4, §1) as well as Shiga like toxins able of binding to the Gb3R (CD77R) having at least 50% amino acid sequence identity to the B-subunit of Shiga toxin (c.f. claim 1, 2).

**Item V**

**3** Reference is made to the following documents:

**D1** US 2002/012658 A1 (WILLIAMS JAMES A ET AL) 31 January 2002 (2002-01-31)

**D2** US 2004/013681 A1 (GREEN ALLAN M) 22 January 2004 (2004-01-22)

**D3** US 2002/081307 A1 (GREEN ALLAN M) 27 June 2002 (2002-06-27)

**D4** WO 02/060937 A (INSTITUT CURIE; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE; INSTITUT) 8 August 2002 (2002-08-08)

**4 Novelty (Article 33(2), PCT)**

**4.1** D1 discloses a vaccine comprising a fusion protein comprising a nontoxin protein

sequence and at least a portion of a bacterial toxin, said bacterial toxin selected from E.coli verotoxin 1 (VT1), VT2 and Shiga toxin (cl 42). Specifically bacterial toxin B-subunits are used (c.f. cl 42, 43). The document further contemplates immunization with or without adjuvant, the adjuvant being e.g. Quil-A or any other adjuvant increasing the immune response (c.f. §170).

Thus, in view of the teachings of D1, the subject matter of claims 1, 2, 4, 5, 7, 9, 16-21 cannot be considered novel in the sense of Article 33(2), PCT.

**4.2 D2 and D3, both claim the use of a toxin-Ag conjugate (alone or) in combination with an adjuvant (claims 1-7), the toxin being pref. STxB, VTxB or CTxB (claim 12) in a vaccine (Fig 1, §11, §25, §26, §45, §46, §89).**

Thus, in view of the teachings of D1, the subject matter of claims 1-4, 16-21 cannot be considered novel in the sense of Article 33(2), PCT.

**4.3 The subject matter of claims 6, 8, 10-15 is considered to be novel in the sense of Article 33(2), PCT.**

### **5 Inventive step (Article 33(3), PCT)**

The subject matter of claims 6, 8, 10-15 would not appear to involve an inventive step in the sense of Art. 33(3), PCT for the following reasons:

D2 (or D3) can be considered to be the closest prior art document and claims the use of a toxin-Ag conjugate alone or in combination with an adjuvant (claims 1-7), the toxin being pref. STxB, VTxB or CTxB (claim 12) in a vaccine (Fig 1, §11, §25, §26, §45, §46, §89).

The subject matter of claims 6, 10-15 differs from D1 in that it discloses a vaccine composition comprising a Gb3 receptor binding toxin-antigen conjugate administered together with different adjuvants such as metal salts, oil in water emulsions, Toll-like receptor agonists, etc.

Therefore, the technical problem is to provide specific adjuvants for a vaccine composition comprising a Gb3 receptor binding toxin-antigen conjugate.

The claimed solution(s) is/are the specific adjuvants listed in claims 6, 10-15.

Starting from the closest prior art document D2 (or D3) it would appear that no inventive skills would be necessary to provide a suitable adjuvant for enhancing the immune response to the STxB-Ag construct. The function of any adjuvant is already per definition

the enhancement of a given immune reaction.

Due to the fact, that Cys coupled STxB-Ag conjugated constructs are also known in the prior art, c.f. e.g. D4 (describes an universal polypeptidic carrier for targeting directly or indirectly to Gb3 and having the formula STxB-Z(n)-Cys) the addition of adjuvants to said specific construct also does not require inventive skills in view of the closest prior art.

Consequently, the subject matter of claims 6, 8, 10-15 would not appear to involve an inventive step in the sense of Article 33(3), PCT.

**6 further remarks**

- 6.1** In a later European regional phase objections might be raised against any expression within the description such as "...incorporated by reference..." (e.g. on p 14 last § - p 15, l 2) as the regional patent law requires that the application is self-contained.
- 6.2** Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(II), PCT, the relevant background art disclosed in D1-D3 would not appear to be mentioned/discussed in the description, nor are these documents identified therein (Guidelines 4.05).

## **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.

**VACUNAS CON ADYUVANTE QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA  
SHIGA**

**RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION**

5

La presente invención proporciona una composición para vacuna que contiene la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente inmunológicamente funcional de ella, que es capaz de fijar el receptor Gb3, que forma complejo con un antígeno, y que  
10 contiene además un adyuvante, siempre que cuando el adyuvante sea solamente una sal metálica esté formulado de tal forma que no más de aproximadamente 50% del antígeno sea adsorbido en la sal metálica. Estas composiciones proporcionan una respuesta inmunológica mejorada comparada con la de la toxina Shiga o con  
15 un equivalente inmunológicamente funcional de ella que forma complejo con un antígeno sin ningún adyuvante, o un antígeno solo con adyuvante.

## **VACUNAS CON ADYUVANTE QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA SHIGA**

La presente invención proporciona composiciones para vacuna  
5 mejoradas, métodos para elaborarlas y su uso en medicina. En particular, la presente invención proporciona composiciones de vacuna con adyuvante que contienen la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente funcional de ella, y un antígeno formulado con un adyuvante.

10 La patente estadounidense número 6613882 describe un polipéptido quimérico de la fórmula: B--X, en donde B representa el fragmento B de la toxina Shiga o un equivalente funcional de ella, y X representa uno o más polipéptidos de significación terapéutica, en donde dichos polipéptidos son compatibles con transporte  
15 retrógrado mediado por B para asegurar el procesamiento o la correcta dirección de X.

WO 02/060937 es una solicitud que describe un portador polipéptido universal para apuntar directa o indirectamente al receptor Gb3 y que tiene la fórmula STxB-Z(n)-Cys; en donde StxB  
20 es la subunidad B del fragmento B de la toxina Shiga, Z es un enlazante aminoácido sin grupos sulfhidrilo, n es 0, 1, 2 o un polipéptido, y Cys es Cisteína.

El desarrollo de vacunas que requieren una inducción predominante de una respuesta celular es todavía un reto. Debido  
25 a que las células T CD8+, las células efectoras principales de la

respuesta inmunitaria celular, reconocen antígenos que son sintetizados en células infectadas con patógenos, la vacunación exitosa requiere la síntesis de antígenos inmunógenos en células del vacunado. Esto puede lograrse con vacunas atenuadas en vivo, sin embargo, ellas también presentan limitaciones significativas. Primero, hay un riesgo de infección, ya sea cuando las vacunas son inmunosuprimidas, o cuando el patógeno por sí solo puede inducir la inmunosupresión (por ejemplo, Virus de Inmunodeficiencia Humana). Segundo, algunos patógenos son difíciles o imposibles de cultivar en cultivo celular (por ejemplo, virus de la hepatitis C). Otras vacunas existentes, tales como vacunas con células completas inactivadas o auxilladas con alumbre, vacunas con subunidad de proteína recombinante, son inductores notablemente deficientes de respuestas de CD8.

Por estas razones, se ha estado desarrollando enfoques alternativos: vacunas vivas vectorizadas, vacunas con ADN plásmido, péptidos sintéticos o adyuvantes específicos. Las vacunas vivas vectorizadas son buenas para inducir una respuesta celular fuerte, pero la inmunidad pre-existente (por ejemplo adenovirus) o inducida por vacuna contra el vector puede comprometer la eficiencia de la dosis de vacuna adicional (Casimiro *et al*, JOURNAL OF VIROLOGY, Junio 2003, p. 6305-6313). las vacunas con ADN plásmido también pueden inducir una respuesta celular (Casimiro *et al*, JOURNAL OF VIROLOGY, Junio 2003, p. 6305-6313), pero ésta permanece débil en los seres humanos (Mc

Conkey *et al*, Nature Medicine 9, 729-735, 2003) y la respuesta del anticuerpo es muy baja. Además, los péptidos sintéticos se están evaluando actualmente en pruebas clínicas (Khong *et al*, J Immunother 2004;27:472-477), pero la eficacia de estas vacunas  
5 que codifican una cantidad limitada de epítopos de células T puede ser obstaculizada por la aparición de mutantes de escape de vacunas o por la necesidad de seleccionar primero los pacientes para la coincidencia de HLA.

También han sido descritos enfoques alternativos basados en  
10 suministro de antígenos usando vectores no vivos tales como toxinas bacterianas. El sistema de vectorización con Shiga B (STxB) está basado en la subunidad B no tóxica de la toxina Shiga. Esta molécula tiene una cantidad de características que parecen predisponerla como un vector para presentación de antígeno:  
15 ausencia de toxicidad, baja inmunogenicidad, apuntamiento a través del receptor CD77 y capacidad para introducir antígeno de carga en la ruta de presentación de antígeno restringida por MHC de clase 1 (Haicheur *et al* (2003) Int. Immunol 15 pp 1161-1171 ). En particular, el enlace físico de los antígenos a la subunidad B de la  
20 toxina Shiga ha demostrado que induce respuestas de CD8 detectables en modelos de ratón (Haicheur *et al*, 2000 Journal of Immunology 165 pp 3301-3308; Haicheur *et al*, 2003 Int. Immunol 15 pp 1161-1171 ). Sin embargo, esta respuesta requería tres inyecciones de cantidades grandes de antígeno (hasta 80 µg,  
25 Haicheur *et al*, 2003 Int. Immunol 15 pp 1161-1171), y no pudo ser

SS

mejorada mezclándolo con adyuvante incompleto de Freund cuando se administró intraperitonealmente. (Halcheur *et al*, 2000 Journal of Immunology 165 pp 3301-3308).

Estas limitaciones de antígenos de vacunas y sistemas de suministro justifican la búsqueda de nuevas composiciones para vacunas. Los presentes inventores han encontrado que la inclusión de adyuvantes en composiciones que contienen la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente funcional inmunológicamente de ellas, pueden tener un efecto beneficioso en la respuesta inmunitaria resultante, en particular respuestas específicas de CD8.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición para vacuna que contiene la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente funcional inmunológicamente de ella, que es capaz de fijar el receptor Gb3, que forma complejo con un antígeno, y que contiene adicionalmente un adyuvante, siempre que cuando el adyuvante sea solamente una sal metálica, esté formulado de tal forma que no más de aproximadamente 60% del antígeno sea adsorbido en la sal metálica.

Los adyuvantes particulares son los que se seleccionan del grupo de sales metálicas, emulsiones de aceite en agua, agonistas del receptor de tipo toll, en particular agonista del receptor tipo toll 2, agonista del receptor tipo toll 3, agonista del receptor tipo toll 4, agonista del receptor tipo toll 7, agonista del receptor tipo toll 8, agonista del receptor tipo toll 9), saponinas o combinaciones de ellas con la condición de que se usen sales metálicas solamente en

ST

combinación con otro adyuvante y no solos, a menos que estén formulados de tal forma que no más de aproximadamente 60% del antígeno sea adsorbido en la sal metálica. Preferiblemente, no más de aproximadamente 50%, por ejemplo 40% del antígeno, es adsorbido en la sal metálica. Preferiblemente, no más del 50%, por ejemplo, 40%, del antígeno, es adsorbido en la sal metálica, y en una modalidad, no más de aproximadamente 30% del antígeno es adsorbido en la sal metálica. El nivel de anticuerpo adsorbido en la sal metálica puede ser determinado mediante técnicas bien conocidas en la materia, tales como el método establecido en el ejemplo 1.5. el nivel de antígeno libre puede ser aumentado, por ejemplo, formulando la composición en la presencia de iones fosfatados, tales como salina regulada fosfatada, o aumentando la proporción de antígeno con respecto a sal metálica. En una modalidad el adyuvante no incluye una sal metálica como único adyuvante. En una modalidad, el adyuvante no incluye una sal metálica. En contraste con la situación demostrada en la técnica anterior, los presente invención han demostrado la capacidad del adyuvante de Freund incompleto para aumentar el efecto de la toxina Shiga (o un equivalente funcional inmunológicamente), y el antígeno cuando tal composición no se administra intramuscularmente. Además, esta mejora de la respuesta de CD8 se observa fácilmente después de una sola inyección y cuando se usan dosis más bajas de antígeno.

25        La subunidad B de la toxina Shiga y sus equivalentes

inmunológicamente funcionales se denominan aquí proteínas de la invención. Los equivalentes funcionales inmunológicamente de la subunidad B de la toxina Shiga se definen, como una proteína, tal como una toxina, una subunidad de toxina o un fragmento funcional de ella, sin limitación a ellas, que es capaz de fijar el receptor Gb3. Esta capacidad de fijación puede ser determinada siguiendo el procedimiento de análisis establecido en el ejemplo 1.2. Se cree que la fijación de Gb3 induce el transporte apropiado del antígeno de interés, y de esta forma promueve su presentación de NHC clase 1. En una modalidad, estas proteínas tienen al menos 50% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad en el nivel aminoácido con respecto a la forma madura de la subunidad B de la toxina Shiga.

Estos equivalentes funcionales inmunológicamente incluyen la subunidad B de toxinas aisladas de una variedad de especies de *Shigella*, en particular *Shigella dysenteriae*. Adicionalmente, los equivalentes funcionales inmunológicamente de la subunidad B de la toxina Shiga incluyen toxinas homólogas que son capaces de fijar el receptor Gb3 de otras bacterias, cuyas toxinas preferiblemente tienen al menos 50% de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la subunidad B de la toxina Shiga. Por ejemplo, la subunidad B de la verotoxina 1 (VT1) de *E. coli* es idéntica a la subunidad B de la toxina Shiga. VT1 y VT2 de *E. coli* se conocen porque fijan el receptor Gb3 y pueden ser usadas en el contexto de la presente invención, así como también otras toxinas similares a

Shiga producidas por otras bacterias. en el contexto de la invención, la palabra toxina significa toxinas que han sido destoxificadas de tal forma que ya no sean tóxicas para los seres humanos, o una subunidad de toxina o fragmento de ella que está  
5 sustancialmente desprovista de actividad tóxica en los seres humanos.

Las composiciones para vacuna de la invención son capaces de mejorar una respuesta inmunitaria específica de CD8. La mejora se mide observando la respuesta a una composición de la invención  
10 que contiene un antígeno que forma complejo con una proteína de la invención y un adyuvante cuando se compara con la respuesta a una composición que contiene un antígeno que forma complejo con respecto a una proteína de la invención sin adyuvante, o la respuesta a una formulación que contiene un antígeno con  
15 adyuvante. La mejora se puede definir como un aumento en el nivel de respuesta inmunitaria, la generación de una respuesta inmunitaria equivalente con una dosis más baja de antígeno, un aumento en la calidad de la respuesta inmunitaria, un aumento en la persistencia de la respuesta inmunitaria, o cualquier combinación  
20 de los anteriores. Una mejora como esta puede observarse después de una primera inmunización, y/o puede ser observada después de inmunizaciones subsiguientes.

En una modalidad de la invención, se puede usar bajas dosis de antígeno (tan bajas como 8 ng de antígeno para un ratón), para  
25 aumentar esta respuesta inmunitaria. En esta modalidad, el

antígeno auxiliado, que forma complejo con una proteína de la invención, puede inducir una respuesta primaria de CD8 (según se mide mediante tinción con tetrámero, tinción con citocina intracelular y actividad citotóxica *in vivo*), que es persistente  
5 cuando se compara con un antígeno auxiliado que no está formando complejo con una proteína de la invención, o un antígeno que está formando complejo con una proteína de la invención, pero sin adyuvante, los cuales son capaces de aumentar una respuesta persistente.

10 La respuesta inmunitaria de CD8 decrece con el tiempo: después del pico, hay una fase de contracción en donde la mayor parte de las células efectoras mueren, mientras que las células de recuerdo sobreviven. El establecimiento de esta población de células T que responden al recuerdo se aprecia tanto por la  
15 detección de células específicas para el antígeno a largo plazo como por su capacidad para ser reforzadas.

Preferiblemente, el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en: un lípido A de saponina o derivado de él, un oligonucleótido inmunoestimulador, un fosfato de  
20 alquilglucosaminida, o combinaciones de ellos. Un adyuvante preferido adicional es una sal metálica en combinación con otro adyuvante. Se prefiere que el adyuvante sea un agonista del receptor de tipo toll, en particular un agonista de un receptor tipo toll 2, 3, 4, 7, 8 o 9, o una saponina, en particular Qs21. Se  
25 prefiere además que el sistema adyuvante contenga dos o más

adyuvantes de la lista anterior. En particular, las combinaciones contienen preferiblemente un adyuvante de saponina (en particular QS21) y un agonista del receptor 4 de tipo toll tal como lípido A monofosforilado o su derivado 3 desacilado, 3D-MPL, o una saponina (en particular QS21) y un ligando del receptor 4 de tipo toll tal como un fosfato de alquil glucosaminida.

Los adyuvantes particularmente preferidos son combinaciones de 3D-MPL y QS21 (WO 95/17210, WO 98/56414), o 3D-MPL formulados con otros portadores (EP 0 689 454 B1). Otros sistemas adyuvantes preferidos comprenden una combinación de 3 D MPL, QS21 y un oligonucleótido CpG tal como el que se describe en US 6558670, US 6544518.

En una modalidad, el adyuvante es un ligando del receptor de tipo toll (TLR) 4, preferiblemente un agonista tal como un derivado de lípido A, particularmente lípido A monofosforilado o más particularmente lípido A monofosforilado 3 desacilado (3D - MPL).

El 3 D - MPL es comercializado bajo la marca comercial MPL® por Corixa Corporation y promueve primordialmente las respuestas de las células T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). Éste puede ser producido de acuerdo con los métodos descritos en GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de lípido A monofosforilado 3 desacilado con cadenas 3, 4, 5 o 6 aciladas. Preferiblemente en las composiciones de la presente invención se usa partícula pequeña de 3 D - MPL. La partícula pequeña 3 D - MPL tiene un tamaño de partícula tal que puede ser esterilizada por

filtración a través de un filtro de 0.22  $\mu$ m. Estas preparaciones se describen en la solicitud de patente Internacional número WO 94/21292. Los derivados sintéticos del lípido A son conocidos, y se piensa que son agonistas de TLR 4 Incluyendo, pero no limitados a:

5 OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanollamino]-4-o-fosfono- $\beta$ -D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]- $\alpha$ -D-glucopiranosil]dihidrogenofosfato), (WO 95/14026).

OM 294 DP (3S,9R)-3--[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-  
10 4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanollamino]decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (WO99 /64301 y WO 00/0462).

OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1-dihidrogenofosfato 10-  
15 (6-aminohexanoato) (WO 01/46127)

Otros ligandos TLR4 que se puede usar son los fosfatos de alquil glucosaminida (AGP), tales como los que se describen en WO9850399 o en US6303347 (también se describen procesos para la preparación de AGP), o sales de AGP aceptables para uso  
20 farmacéutico, tales como las que se describen en US 6764840. Algunos AGP son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4. Se piensa que ambos son útiles como adyuvantes.

Otro Inmunoestimulante preferido para su uso en la presente Invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de  
25 saponina aislada del árbol sudamericano Quilaja Saponaria Molina,

62

y fue descrito primero como que tenía actividad adyuvante por Dalsgaard *et al.* en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254). Se ha aislado fragmentos purificados de Quil A mediante  
5 HPLC, los cuales mantienen la actividad sin la toxicidad asociada con Quil A (EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocido como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de Quillaja saponaria Molina, la cual induce la respuesta de las células T citotóxicas CD8+ (CTL), células Th1 y  
10 un anticuerpo IgG2a predominante, y es una saponina preferida en el contexto de la presente invención.

Se ha descrito formulaciones particulares de QS21 que son particularmente preferidas, estas formulaciones contienen además un esteroide (WO 96/33739). Las saponinas que forman parte de la  
15 presente invención pueden ser separadas en la forma de micelos, micelos mezclados (preferiblemente, pero no exclusivamente, con sales de bilis) o pueden estar en la forma de matrices ISCOM (EP 0 109 942 B1), liposomas o estructuras coloidales tales como complejos tipo gusano o tipo anillo o estructuras con capas lípidas y  
20 laminillas cuando se formulan con colesterol y lípidos, o en la forma de un aceite en emulsión acuosa (por ejemplo como en WO 95/17210). Las saponinas pueden estar asociadas preferiblemente con una sal metálica, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (WO 98/15287). Preferiblemente, la saponina se presenta  
25 en la forma de un liposoma, ISCOM o un aceite en emulsión acuosa.

64

Los oligonucleótidos Inmunoestimuladores o cualquier otro agonista del receptor tipo toll 9, se pueden usar también. Los oligonucleótidos preferidos para su uso en adyuvantes o vacunas de la presente invención son oligonucleótidos que contienen CpG, 5 preferiblemente que contienen dos o más motivos CpG dinucleóticos separados por al menos tres, más preferiblemente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanina. Los oligonucleótidos de CpG de la presente invención típicamente son desoxinucleótidos. En 10 una modalidad preferida, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace fosforotioato, si bien los enlaces fosfodiéster y otros enlaces internucleótidos están dentro del alcance de la invención. También están incluidos dentro del alcance de la invención los oligonucleótidos con enlaces 15 internucleótidos mixtos. Los métodos para producir oligonucleótidos fosforotioato o fosforoditioato se describen en US 5,666,153, US 5,278,302 y WO 95/26204.

Los ejemplos de los oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes secuencias. Las secuencias preferiblemente contienen 20 enlaces internucleótidos modificados con fosforotioato.

OLIGO 1 (SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT  
(CpG 1826)

OLIGO 2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG  
1758)

25 OLIGO 3 (SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC

**GGC ACC ACG**

**OLIGO 4 (SEQ ID N0:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC  
GTT (CpG 2008)**

**OLIGO 5 (SEQ ID N0:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT  
5 (CpG 1668)**

**OLIGO 6 (SEQ ID N0:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC  
G (CpG 5456)**

**Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden contener las  
secuencias preferidas anteriores, en las que hay delecciones o  
10 adiciones a ellas sin consecuencias.**

**Los oligonucleótidos CpG utilizados en la presente invención  
pueden ser sintetizados mediante cualquier método conocido en la  
materia (por ejemplo, véase EP 468520). De manera conveniente,  
estos oligonucleótidos pueden ser sintetizados utilizando un  
15 sintetizador automático.**

**Los ejemplos de un agonista de TLR2 incluyen peptidoglican o  
lipoproteína.**

**Las imidazoquinolinas, tales como imiquimod y resiquimod,  
son agonistas de TLR7 conocidos.**

**20 El ARN monocatenario también es un agonista de TLR  
conocido (TLR8 en seres humanos y TLR7 en ratones), mientras  
que el ARN bicatenario y el poly I:C (ácido poliinosínico-policitídico -  
un imitador sintético comercial del ARN viral), son ejemplos de  
agonistas de TLR3. El 3D-MPL es un ejemplo de un agonista de  
25 TLR4, mientras que el CPG es un ejemplo de un agonista de TLR9.**

En una modalidad, la subunidad B de la toxina Shiga o equivalente de ella funcional inmunológicamente, y el antígeno, forman juntos un complejo. Por formar un complejo se quiere decir que la subunidad B de la toxina Shiga o su equivalente funcional y el antígeno están asociados físicamente, por ejemplo por medio de una interacción electrostática o hidrofóbica o un enlace covalente. En una modalidad preferida, la subunidad B de la toxina Shiga y el antígeno están unidos covalentemente ya sea como proteína de fusión (Haicheur *et al*, 2000 Journal of Immunology 165 pp 3301-3308) o ligados por medio de un residuo de cisteína en la forma que se describe en WO 02/060937 (*supra*). En modalidades de la invención, más de un antígeno está ligado a cada molécula de toxina B, tal como 2,3,4,5 6 moléculas de antígeno por toxina B. Cuando está presente más de un ingrediente, estos antígenos pueden ser todos los mismos, uno o más pueden ser diferentes de los otros, o todos los antígenos pueden ser diferentes uno del otro.

El antígeno por sí solo puede ser un péptido, o una proteína que comprende uno o más epítopos de interés. Una modalidad preferida es que el antígeno se seleccione de tal forma que cuando se formula en la manera contemplada por la invención, proporciona inmunidad contra los patógenos intracelulares, tales como VIH, tuberculosis, Clamidia, VHB, VHC, e Influenza. La presente invención también encuentra utilidad con antígenos que pueden originar respuestas inmunitarias relevantes contra trastornos benignos y proliferativos tales como cánceres.

Preferiblemente, las formulaciones para vacuna de la presente invención contienen un antígeno o una composición antigénica capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria contra un patógeno humano, cuyo antígeno o composición antigénica proviene del VIH-1 (tal como gag o fragmentos de ella, p24, tat, nef, envoltura tal como gp120 o gp160, o fragmentos de cualquiera de ellas), virus de herpes humano, tales como gD o derivados de ellos o proteína temprana inmediata tal como ICP27 de VSH1 o VSH2, citomegalovirus (esp humano) (tal como gB o derivados de ella), antígeno rotaviral, virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados de ella), virus de *Varicella Zoster* (tal como gpl, II y IE63), o de un virus de hepatitis tal como el virus de hepatitis B (por ejemplo antígeno superficial de hepatitis B o un derivado de él), o antígenos del virus de hepatitis A, virus de hepatitis C y virus de hepatitis E, o de otros patógenos virales, tales como paramixovirus: virus respiratorio sincitial (tales como proteínas F G y N o sus derivados), virus de parainfluenza, virus del sarampión, virus de paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo VPH 6, 11, 16, 18) flavivirus (por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, virus de encefalitis japonesa) o virus de la influenza o sus proteínas purificadas o recombinantes, tales como proteínas HA, NP, NA, o M, o combinaciones de ellas), o provenientes de patógenos bacteriales tales como *Neisseria spp*, incluyendo *N. gonorrhea* y *N. meningitidis* (por ejemplo, proteínas fijadoras de transferrina, proteínas fijadoras

de lactoferrina, PIIC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo proteínas M o fragmentos de ellas, proteasa C5A), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp*, incluyendo *M catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo

5 adhesinas e invasiones de alto y de bajo peso molecular); *Bordetella spp*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo pertactina, toxina de pertussis o sus derivados, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbriae), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo

10 ESAT6, Antígeno 85A, -B o -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo factores de colonización, toxina lábil al calor o sus derivados, toxina estable al calor o sus derivados), *E. coli*

15 enterohemorrágica, *Vibrio spp* de *E. coli* enteropatógena, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera o sus derivados); *Shigella spp*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*; *Yersinia spp*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp*,

20 incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Salmonella spp*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina vacuolante); *Pseudomonas spp*, incluyendo

25 *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S.*

*epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo toxina del tétano y sus derivados), *C. botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y sus derivados), *C. difficile* (por ejemplo toxinas A o B de *Clostridium* y sus derivados); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina botulínica y sus derivados); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo toxina de difteria y sus derivados); *Borrelia spp.*, incluyendo *S. burgdorferi* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *S. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *S. andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas fijadoras de heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas fijadoras de heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas raras de la membrana exterior), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; o provenientes de parásitos tales como *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *Leishmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*;

*Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*, o derivadas de levadura, tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*.

Otros antígenos específicos preferidos para *M. tuberculosis* son por ejemplo Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (WO 99/51748). Las proteínas para *M. tuberculosis* también incluyen proteínas de fusión y variantes de ellas en donde al menos dos, preferiblemente tres polipéptidos de *M. tuberculosis* están fusionados en una proteína más grande. Las fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTTC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTTC2, TbH9-DPV-MTI (WO 99/51748).

Los antígenos más preferidos para *Chlamidia* incluyen por ejemplo la proteína de alto peso molecular (HMW) (WO 99/17741), ORF3 (EP 366 412), y las supuestas proteínas de membrana (Pmp). Otros antígenos para *Chlamidia* de la formulación para vacuna pueden seleccionarse del grupo que se describe en WO 99/28475.

Las vacunas bacteriales preferidas contienen antígenos provenientes de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (por ejemplo, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas fijadoras de colina) y el antígeno de proteína Pneumolisina (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins *et al.*, Microbial Pathogenesis, 25, 337-342), y sus derivados mutantes destoxificados (WO 90/06951; WO 99/03884). Otras vacunas bacteriales preferidas contienen antígenos provenientes de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B,

*H. influenzae* no tipeable, por ejemplo OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbrina y péptidos derivados de fimbrina (US 5,843,464) o variantes de múltiples copias o proteínas de fusión de ellas.

5 Los derivados del antígeno superficial de la hepatitis B son bien conocidos en la técnica, e incluyen, entre otros, los antígenos S PreS1, PreS2 que se describen en las solicitudes de patente europea EP-A-414 374; EP-A-0304 578, y EP 198-474. En un aspecto preferido, la formulación para vacuna de la invención  
10 contiene el antígeno VIH-1, gp120, especialmente cuando se expresa en células CHO. En una modalidad adicional, la formulación para vacuna de la invención contiene gD2t tal como se definió aquí anteriormente.

En una modalidad preferida de la presente invención las  
15 vacunas que contienen el adyuvante que se reivindica contienen antígeno derivado del virus del papiloma humano (VPH), considerado responsable de verrugas genitales (VPH 6 o VPH 11 y otros), y los virus del VPH responsables del cáncer cervical (VPH 16, VPH 18 y otros).

20 Las formas particularmente preferidas de la vacuna profiláctica o terapéutica para verrugas genitales contiene proteína L1, y proteínas de fusión que contienen uno o más antígenos seleccionados de las proteínas del VPH E1, E2, E5, E6, E7, L1 y L2.

25 Las formas más preferidas de proteína de fusión son: L2E7

tal como se describe en WO 96/26277, y la proteína D(1/3)-E7 descrita en WO99/10375.

Una composición preferida para vacuna profiláctica o terapéutica contra infección cervical o cáncer por VPH, puede  
5 contener antígenos de VPH 16 o 18.

Los antígenos de VPH 16 particularmente preferidos contienen las proteínas tempranas E6 o E7 en fusión con un portador de proteína D para formar fusiones de proteína D - E6 o E7 de VPH16, o combinaciones de ellos, o combinaciones de E6 o de E7 con L2  
10 (WO 96/26277).

Alternativamente, las proteínas tempranas E6 y E7 del VPH 16 o 18, pueden ser presentadas en una sola molécula, preferiblemente una proteína de fusión D-E6/E7. Esta vacuna puede contener opcionalmente cualquiera o ambas proteínas E6 y  
15 E7 del VPH 18, preferiblemente en la forma de una proteína de fusión Proteína D - E6 o Proteína D - E7 o una proteína de fusión D E6/E7.

La vacuna de la presente invención puede contener adicionalmente antígenos de otras cepas de VPH, preferiblemente  
20 de cepas de VPH 31 o 33.

Las vacunas de la presente invención contienen además antígenos derivados de parásitos que causan malaria, por ejemplo, antígenos de *Plasmodia falciparum* incluyendo proteína circumsporozoita (proteína CS), RTS1S, MSP1, MSP3, LSA1, LSA3,  
25 AMA1 y TRAP. La RTS es una proteína híbrida que contiene

sustancialmente toda la parte del terminal C de la proteína circumsporozoita (CS) de *P.falciparum* ligada por cuatro aminoácidos de la parte preS2 del antígeno superficial de la hepatitis B al antígeno superficial (S) del virus de la hepatitis B. Su estructura completa se describe en la solicitud de patente Internacional número PCT/EP92/02591, publicada bajo el número WO 93/10152, la cual reclama prioridad sobre la solicitud de patente UK No. 9124390.7. Cuando se expresa en levadura, la RTS es producida como una partícula de lipoproteína, y cuando se co-expre-  
10 expresa con el antígeno S del VBH produce una partícula mixta conocida como RTS,S. Los antígenos TRAP están descritos en la solicitud de patente internacional No. PCT/GB89/00895, publicada bajo el número WO 90/01496. Los antígenos de Plasmodia que son candidatos probables para ser componentes de una vacuna  
15 multietapas para la Malaria son *P. falciparum* MSP1 , AMA1 , MSP3, EBA, GLURP, RAP1 , RAP2, Secuestrina, PfEMPI , Pf332, LSA1 , LSA3, STARP, SALSA, PfEXPI , Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en *Plasmodium spp.* Una modalidad de la presente invención es una vacuna contra la Malaria  
20 en donde la preparación de antígeno contiene RTS,S o proteína CS o un fragmento de ella tal como la porción CS de RTS,S, en combinación con uno o más antígenos maláricos, cualquiera o ambos de los cuales pueden estar unidos a la subunidad B de la toxina Shiga de acuerdo con la invención. El uno o más antígenos  
25 maláricos adicionales pueden ser seleccionados, por ejemplo, del

grupo que consiste en MPS1 , MSP3, AMA1 , LSA1 o LSA3.

Las formulaciones también pueden contener un antígeno anti-tumoral y pueden ser útiles para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Por ejemplo, la formulación adyuvante encuentra  
5 utilidad con antígenos para el rechazo de tumores tales como los de próstata, mama, colorectal, pulmón, pancreático, renal o melanoma. Los ejemplos de antígenos incluyen MAGE 1 y MAGE 3 u otros antígenos MAGE (para el tratamiento de melanoma), PRAME, BAGE, o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996, Current Opinions In  
10 Immunology 8, pps 628-636; Van den Eynde *et al.*, International Journal of Clinical & Laboratory Research (presentado en 1997); Correale *et al.* (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p293. Sin duda, estos antígenos se expresan en una amplia gama de tipos de tumores tales como melanoma, carcinoma de pulmón,  
15 sarcoma y carcinoma de vejiga. Otros antígenos específicos para tumores son apropiados para su uso con los adyuvantes de la presente invención e incluyen gangliósidos específicos para tumor, pero no están restringidos a ellos, antígeno específico para próstata (PSA), o Her-2/neu, KSA (GA733), PAP, mamaglobina, MUC-1,  
20 antígeno carcinoembrionario (CEA). De acuerdo con esto en un aspecto de la presente invención se proporciona una vacuna que contiene una composición adyuvante de acuerdo con la invención y un antígeno para el rechazo de tumor.

Un aspecto particularmente preferido de la presente invención  
25 es que las vacunas contienen un antígeno para un tumor tal como

cánceres de próstata, de mama, colorectal, de pulmón, pancreático, renal, ovárico o melanoma. De acuerdo con esto, las formulaciones pueden contener antígeno asociado con el tumor, así como también antígenos asociados con mecanismos de soporte tumoral (por ejemplo, angiogénesis, invasión tumoral). Adicionalmente, los antígenos particularmente relevantes para las vacunas en la terapia de cáncer también comprenden antígeno de membrana específico par próstata (PSMA), antígeno para células madre de próstata (PSCA), tirosinada, survivina, NY-ESO1, prostasa, PS108 (WO 98/50587), RAGE, LAFE, HAGE. Adicionalmente, dicho antígeno puede ser una hormona auto péptida tal como una hormona liberadora de la hormona gonadotropina de longitud completa (GnRH, WO 95/20600), un péptido corto de 10 aminoácidos de longitud, útil en el tratamiento de muchos cánceres, o en Inmunocastración.

Las vacunas de la presente invención pueden usarse para la profilaxis o terapia de alergia. Estas vacunas podrían contener antígenos específicos para el alérgeno, por ejemplo Der p1.

La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna seleccionada es una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos colaterales adversos significativos en vacunados típicos. Esta cantidad variará dependiendo de qué Inmunógeno específico se emplea y de cómo se presenta. Cuando una composición contiene una sal metálica como único adyuvante, un conocedor de la materia se dará cuenta de que el nivel de

✂

antígeno libre (medido, por ejemplo, mediante el método establecido en el ejemplo 1.5) será la cantidad determinante para la inmunoprotección.

Generalmente, se espera que cada dosis humana contendrá desde 0.1 hasta 1000  $\mu\text{g}$  de antígeno, preferiblemente desde 0.1 hasta 500  $\mu\text{g}$ , preferiblemente desde 0.1 hasta 100  $\mu\text{g}$ , mucho más preferible desde 0.1 hasta 50  $\mu\text{g}$ . Una cantidad óptima para una vacuna particular se puede determinar mediante estudios estándar que involucran la observación de respuestas inmunitarias apropiadas en sujetos vacunados. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas adecuadamente. Una formulación para vacuna como esta puede aplicarse a una superficie mucosa de un mamífero en un régimen de vacunación sensibilizadora o de refuerzo, o alternativamente se puede administrar sistémicamente, por ejemplo por vía transdérmica, subcutánea o intramuscular. Se prefiere la administración intramuscular.

La cantidad de 3 MPL usada generalmente es pequeña, pero dependiendo de la formulación de la vacuna puede estar en la región de 1 a 1000  $\mu\text{g}$  por dosis, preferiblemente de 1 a 500  $\mu\text{g}$  por dosis, y más preferiblemente entre 1 y 100  $\mu\text{g}$  por dosis.

La cantidad de oligonucleótidos CpG o inmunoestimuladores en los adyuvantes o vacunas de la presente invención generalmente es pequeña, pero dependiendo de la formulación de la vacuna puede estar en la región de 1 a 1000  $\mu\text{g}$  por dosis, preferiblemente

३२

de 1 a 500  $\mu\text{g}$  por dosis, y más preferiblemente entre 1 y 100  $\mu\text{g}$  por dosis.

La cantidad de saponina para su uso en los adyuvantes de la presente invención puede estar en la región de 1 a 1000  $\mu\text{g}$  por dosis, preferiblemente de 1 a 500  $\mu\text{g}$  por dosis, más preferiblemente de 1 a 250  $\mu\text{g}$  por dosis, y mucho más preferiblemente entre 1 y 100  $\mu\text{g}$  por dosis.

Las formulaciones de la presente invención pueden usarse tanto para propósitos profilácticos como terapéuticos. De acuerdo con esto, la invención proporciona una composición para vacuna como la que se describe aquí, para su uso en medicina.

En una modalidad adicional, se proporciona un método para tratar a un individuo susceptible de sufrir de una enfermedad mediante la administración de una composición sustancialmente tal como la que se describe aquí.

También se proporciona un método para prevenir que un individuo contraiga una enfermedad seleccionada del grupo que comprende enfermedades infecciosas bacteriales y virales, enfermedades parásitas, particularmente enfermedad patógena intracelular, enfermedades proliferativas tales como cánceres de próstata, mama, colorectal, de pulmón, pancreático, renal, de ovario o melanoma; trastornos no cancerosos crónicos, alergia, que comprende la administración de una composición sustancialmente tal como la que se describe aquí a dicho individuo.

Adicionalmente, se describe un método para inducir una

respuesta inmunitaria específica para un antígeno de CD8+ en un mamífero, el cual comprende administrar a dicho mamífero una composición de la invención. Además se proporciona un método para la fabricación de una vacuna que comprende mezclar un antígeno en combinación con la subunidad B de la toxina Shiga o un

5 equivalente funcional inmunológico de ella mezclado con un adyuvante.

Los ejemplos de excipientes aceptables farmacéuticamente para su uso en las combinaciones de la presente invención incluyen, entre otros, agua, salina regulada fosfatada, soluciones

10 reguladoras isotónicas.

Todas las publicaciones, incluyendo, sin limitación a ellas, patentes y solicitudes de patente, citadas en esta especificación, están incorporadas aquí mediante referencia tal como si cada publicación individual estuviera indicada específica e

15 individualmente para ser incorporada aquí mediante referencia como si estuviera expuesta aquí en su totalidad.

La presente invención es ejemplificada mediante referencia a los siguientes ejemplos y figuras. En todas las figuras, se usó adeno-ova (vector adenovirus que contiene proteína OVA) como un

20 control positivo en la primera inyección. El P/B (sensibilizador/refuerzo) es un control positivo con la primera inyección de Adeno-Ova, y la segunda inyección de refuerzo de proteína Ova en AS A (AS H en la figura 6B).

25       Figura 1: Frecuencia de CD8 específica para siinfección en PBL

7 días después de la primera inyección con las vacunas AS A STxB Ova y AS H STxB Ova.

Figura 2: Frecuencia de CD8 específica para siInfekl en PBL 14 días después de la primera inyección con las vacunas AS A STxB Ova y AS H STxB Ova.

Figura 3: persistencia de respuesta de células T efectoras evaluada en PBL a través de células T CD8 productoras de citocina específica para siInfekl el día 15 después de la primera inyección con las vacunas AS A STxB Ova y AS H STxB Ova.

Figura 4: persistencia de respuesta de células T efectoras evaluada en PBL a través de células T CD8 productoras de citocina específica para el antígeno el día 15 después de la primera inyección con las vacunas AS A STxB Ova y AS H STxB Ova.

Figura 5: respuesta de células T efectoras evaluada mediante la actividad citotóxica detectada *in vivo* 15 días después de la primera inyección con las vacunas AS A STxB Ova y AS H STxB Ova.

Figura 6: (A) Frecuencia de CD8 específica para siInfekl en PBL 47 días después de la segunda inyección con las vacunas AS A STxB Ova y AS H STxB Ova. (B) Cinética de la frecuencia de CD8 específica para siInfekl en PBL desde el día 0 hasta el día 98.

Figura 7: respuesta de células T efectoras evaluada a través de células T CD4 productoras de citocina específica para antígeno en PBL 47 días después de la segunda inyección con las vacunas AS A y AS H STxB Ova.

**Figura 8: respuesta de células T efectoras evaluada a través de células T CD8 productoras de citocina específica para el antígeno en PBL 47 días después de la segunda inyección con las vacunas AS A y AS H STxB Ova.**

**5      Figura 9: respuesta de células T efectoras evaluada mediante la actividad citotóxica detectada *in vivo* 47 días después de la segunda inyección con las vacunas AS A STxB Ova y AS H STxB Ova.**

**10      Figura 10A: respuesta humoral 15 días y 40 días después de la segunda inyección con las vacunas AS A STxB Ova y AS H STxB Ova.**

**Figura 10B: frecuencia de células B con recuerdo Anti-Ova evaluadas en el bazo 78 días después de la segunda inyección de ASH STxB-OVA.**

**15      Figura 11: frecuencia de CD8 específica para siinfekl en PBL con vacunas AS A, AS F, AS D, AS E, STxB-ova 13 días después de la primera inyección.**

**20      Figura 12A: frecuencia de CD8 específica para siinfekl en PBL con vacunas AS A, AS B, AS C, AS G, AS I, y AS H STxB-ova 15 días después de la primera inyección.**

**Figura 12B: frecuencia de CD8 específica para siinfekl en PBL con vacunas AS A, AS B, AS C, AS G, AS I, y AS H STxB-ova 6 días después de la segunda inyección.**

**25      Figura 13: frecuencia de CD8 específica para siinfekl en PBL para diferentes dosis de vacunas STxB-ova formuladas con la**



misma dosis de AS H.

Figura 14: evaluación de la respuesta inmunitaria inducida *in vivo* por STxB-ova con AS J (dos dosis) o AS K medida en PBL 14 días después de la primera inyección. (A) frecuencia de CD8 específica para siinfekl. (B) frecuencia de CD8 productoras de citocina específica para el antígeno. (C) lisis específica para siinfekl detectada *in vivo*.

Figura 15: frecuencia de CD8 específica para siinfekl en PBL con vacunas AS L, AS G, AS M STxB-ova 14 días después de la primera inyección.

Figura 16: frecuencia de CD8 específica para siinfekl en PBL con vacunas AS B, AS C, AS K, AS F o AS T STxB-ova 14 días después de la primera inyección.

Figura 17: frecuencia de CD8 específica para siinfekl en PBL con vacunas AS B, AS N, AS I STxB-ova 14 días después de la primera inyección.

Figura 18: frecuencia de CD8 específica para siinfekl en PBL 14 días después de la primera inyección con vacunas AS G, AS O, AS P, AS Q STxB-ova.

Figura 19: frecuencia de CD8 específica para siinfekl en PBL 14 días después de la primera inyección con vacunas AS G, AS R, AS S STxB-ova.

Figura 20: respuesta humoral detectada 15 días después de la segunda inyección realizada ya sea 14 o 42 días después de la primera inyección con la vacuna AS A STxB-ova.

**Figura 21: frecuencia de CD8 específica para siinfekl 14 días después de la primera inyección con las vacunas AS G, AS L, AS U, AS V STxB.**

**Figura 22: frecuencia de CD8 específica para siinfekl 14 días después de la primera inyección con las vacunas ASW1, ASW2-ova.**

### **Ejemplos:**

#### **1. Reactivos y medios**

##### **1.1. Preparación de STxB-Ova auxiliado**

STxB acoplada con ovalbúmina de pollo de longitud completa: para permitir el acoplamiento químico de proteínas a un sitio aceptor definido en STxB, se añadió una cisteína al término C de la proteína de tipo natural, para producir STxB-Cys. La proteína mutante recombinante STxB-Cys fue producida como se describió previamente (Haicheur *et al.*; 2000, J. Immunol.165, 3301). La concentración de endotoxina determinada mediante el análisis Limulus estuvo por debajo de 0.5 EU/mL. La STxB-ova ha sido descrita previamente (HAICHEUR *et al.*, 2003, Int. Immunol. ,15, 1161-1171) y fue proporcionada gentilmente por Ludger Johannes y Eric Tartour (Curie Institute). Se formuló StxB acoplada con ovalbúmina de pollo de longitud completa en cada uno de los sistemas adyuvantes mencionados más adelante.

##### **1.2 Análisis de fijación de Galablosa**

El receptor Gb3 reconocido preferencialmente por la subunidad B de toxina Shiga es un glicosfingolípido de superficie celular, globotriaosilceramida (glucosilceramida Gal $\alpha$ 1-4 Gal $\beta$ 1-4),

en donde Gal es Galactosa. El método que se describe más adelante está basado en el descrito por Tarrago-Trani (Protein Extraction y Purification 38, pp 170- 176, 2004), e involucra una cromatografía por afinidad en un gel de agarosa enlazado con galabiosa disponible comercialmente (calbiochem). La galabiosa (Gal $\alpha$ 1->4Gal) es la porción carbohidrato terminal de la porción oligosacárida de Gb3 y se piensa que representa la estructura mínima reconocida por la Subunidad B de toxina Shiga. Este método ha sido usado exitosamente para purificar la toxina Shiga directamente de lisado de *E. coli*. En consecuencia, puede asumirse que las proteínas que fijan esta porción fijarán el receptor Gb3.

La proteína de interés en regulador PBS (500 $\mu$ l) se mezcla con 100  $\mu$ l de resina galabiosa inmovilizada (Calbiochem) equilibrada previamente en el mismo regulador, y se incuba durante 30 min hasta 1 hora a 4°C en una rueda giratoria. Después de una primera centrifugación a 5000 rpm durante 1 min, se lavan dos veces los gránulos con PBS. Luego se eluye el material unido dos veces re-suspendiendo el granulado final en 2 x 500  $\mu$ l de 100 mM de glicina con pH 2.5. Las muestras correspondientes al flujo a través, los lavados agrupados y los eluidos agrupados se analizan luego mediante SDS Page, tinción con Coomassie y detección Western. Estas técnicas analíticas permiten la identificación de si la proteína está unida a la galabiosa, y por lo tanto se fijará al receptor Gb3.

### 1.3 - Preparación de emulsión de aceite en agua para su uso en

**sistemas adyuvantes.**

Para la preparación de emulsión de aceite en agua se siguió el procedimiento tal como se expone en WO 95/17210. La emulsión contiene: 5% de escualeno, 5% de tocoferol, 2.0% de Tween 80; el tamaño de partícula es de 180 nm.

**Preparación de emulsión de aceite en agua (concentrada 2 veces)**

Se disolvió Tween 80 en salina fosfatada regulada (PBS) para dar una solución al 2% en la PBS. Para proporcionar 100 mL de emulsión concentrada dos veces, se sometió a vórtice 5g de alfa tocoferol DL y 5ml de escualeno hasta que se mezcló cuidadosamente. Se le añadió 90mL de solución de PBS/Tween y se mezcló completamente. Luego se hizo pasar la emulsión resultante a través de una jeringa, y finalmente se microfluidizó usando una máquina para microfluidización M110S. Las gotitas de aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm.

**1.4 - Preparación de sistemas adyuvantes.****1.4.1 Sistema adyuvante A: QS21 y 3D-MPL**

Una mezcla de lípido (tal como fosfatidilcolina, ya sea de clara de huevo o sintética) y colesterol y 3 D-MPL en solvente orgánico, se secó al vacío (o alternativamente bajo una corriente de gas inerte). Una solución acuosa (tal como salina fosfatada regulada) se añadió entonces, y se agitó el recipiente hasta que todo el lípido estaba en suspensión. Esta suspensión se microfluidizó luego hasta que el tamaño del liposoma fue reducido a

aproximadamente 100 nm, y luego se secó estérilmente a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ . La extrusión o la sonicación podrían reemplazar este paso. Típicamente la proporción colesterol:fosfatidilcolina fue de 1:4 (p/p), y se añadió la solución acuosa para dar una  
5 concentración final de colesterol de 5 a 50 mg/mL.

Los liposomas tienen un tamaño definido de 100 nm y se hace referencia a ellos como SUV (de Small Unilamellar Vesicles, vesículas unilaminares pequeñas). Los liposomas por sí solos son estables en el tiempo y no tienen capacidad fusógena. Se le añadió  
10 solución en bruto de SUV estéril a la PBS hasta alcanzar una concentración final de 10, 20 o 100  $\mu\text{g/ml}$  de 3D-MPL. La composición de la PBS fue  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 9 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 48 mM;  $\text{NaCl}$ : 100 mM, con pH 6.1. Se le añadió QS21 en solución acuosa a las SUV. Se hace referencia a esta mezcla como DQMPLin. Luego  
15 se le añadió Stx-OVA. Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos. Se verificó el pH y se ajustó cuando fue necesario a 6.1  $\pm$  0.1 con NaOH o HCl.

En los experimentos descritos en la sección 3.1 más adelante, la StxB-OVA tuvo una concentración de 4, 10, 20 o 100  $\mu\text{g/ml}$  y 3D-  
20 MPL y QS21 tuvieron una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ . En estos casos, el volumen de inyección de 50  $\mu\text{l}$  correspondió a 0.2-5  $\mu\text{g}$  de STxB-OVA y 0.5  $\mu\text{g}$  de 3D-MPL y QS21. Los resultados para una inyección de 0.2  $\mu\text{g}$  de STxB-OVA se muestran en las figuras 1 - 10. También se llevaron a cabo experimentos en donde un volumen de  
25 inyección de 50  $\mu\text{l}$  correspondió a 0.5, 1 y 5  $\mu\text{g}$  de STxB-OVA. Estos

AS

experimentos dieron resultados comparables a los que se muestran en las figuras 1 hasta 10.

En otros experimentos, StxB-OVA tuvo una concentración de 20 o 40  $\mu\text{g/ml}$  y 3D- MPL y QS21 tuvieron una concentración de 20 o 100  $\mu\text{g/ml}$ . En estos experimentos, el volumen de inyección de 25  $\mu\text{l}$  correspondió a 0.5  $\mu\text{g}$  de STXB- OVA y 0.5  $\mu\text{g}$  de 3D-MPL y QS21 (se muestran en las figuras 12A y 12B) o 1  $\mu\text{g}$  STxB- OVA y 2.5 $\mu\text{g}$  de cada una de 3D-MPL y QS21 (se muestran en las figuras 11 y 20)

#### 10 **1.4.2 Sistema adyuvante B: QS21**

##### **1.4.2.1 : Sistema adyuvante B1**

El adyuvante se preparó de acuerdo con los métodos usados para el sistema adyuvante A, pero omitiendo el 3 D-MPL. StxB-OVA y QS21 se ajustaron hasta obtener una concentración de 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$ . Los volúmenes de inyección de 25 o 50 $\mu\text{l}$  correspondieron a 0.5  $\mu\text{g}$  de StxB-OVA y 0.5  $\mu\text{g}$  de QS21 (tal como se muestra en las figuras 12A, 12B y 17).

##### **1.4.2.2:Sistema adyuvante B2**

Se diluyó QS21 hasta obtener una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  en PBS con pH 6.8 antes de añadir StxB-OVA hasta alcanzar una concentración final del antígeno de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Un volumen de inyección de 25  $\mu\text{l}$  correspondió a 1  $\mu\text{g}$  de StxB-OVA y 2.5  $\mu\text{g}$  de QS21 (tal como se muestra en la figura 16)

#### **1.4.3 Sistema adyuvante C: 3D-MPL**

##### 25 **1.4.3.1 :Sistema adyuvante C1**

87

Se diluyó solución en bruto de 3D-MPL a 100 o 200  $\mu\text{g/mL}$  en una solución de sacarosa hasta una concentración final de 9.25%. Se le añadió StxB-OVA hasta alcanzar una concentración del antígeno de 20 o 40  $\mu\text{g/mL}$ .

- 5 El volumen de inyección de 25  $\mu\text{l}$  correspondió a 1  $\mu\text{g}$  de StxB-OVA y 5  $\mu\text{g}$  de 3D-MPL (como puede verse en la figura 16) o 0.5  $\mu\text{g}$  de StxB-OVA y 2.5  $\mu\text{g}$  de 3D-MPL (no se muestran los resultados, pero son comparables).

#### **1.4.3.2: Sistema adyuvante C2**

- 10 El adyuvante se preparó de acuerdo con los métodos usados para el sistema adyuvante A, pero omitiendo el QS21.

Se ajustó StxB-OVA y MPL hasta una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ .

- 15 Un volumen de inyección de 50  $\mu\text{l}$  correspondió a 0.5  $\mu\text{g}$  de StxB-OVA y 0.5  $\mu\text{g}$  de MPL.

#### **1.4.4 Sistema adyuvante D: 3D-MPL y QS21 en una emulsión de aceite en agua**

- 20 Se le añadió emulsión estéril en bruto preparada como en el ejemplo 1.3, a PBS hasta alcanzar una concentración final de 250 o 500  $\mu\text{l}$  de emulsión por mL (v/v). Luego se le añadió 3 D-MPL hasta alcanzar una concentración final de 50 o 100  $\mu\text{g/mL}$ . Después se añadió QS21 hasta alcanzar una concentración final de 50 o 100  $\mu\text{g}$  por mL. Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos. Luego se añadió StxB-OVA hasta  
25 alcanzar una concentración final de 10 o 40  $\mu\text{g/mL}$ . Quince minutos

más tarde, se verificó el pH y se ajustó cuando fue necesario a 6.8 +/- 0.1 con NaOH o con HCl.

El volumen de inyección de 25 o 50  $\mu\text{L}$  correspondió a 0.5 o 1  $\mu\text{g}$  de STxB-Ova, 2.5  $\mu\text{g}$  de 3 D- MPL y QS21, 12.5  $\mu\text{L}$  o 25 $\mu\text{L}$  de emulsión. Un experimento donde se usó un volumen de inyección de 50 $\mu\text{l}$  se muestra en la figura 11. El experimento usando un volumen de inyección de 25  $\mu\text{L}$  dio resultados comparables.

**1.4.5 Sistema adyuvante E: alta dosis de 3D-MPL y QS21 en una emulsión de aceite en agua.**

Se le añadió emulsión estéril en bruto emulsión preparada como en el ejemplo 1.3 a la PBS hasta alcanzar una concentración final de 500  $\mu\text{L}$  de emulsión por mL (v/v). Se añadió 200 $\mu\text{g}$  de 3D-MPL y 200  $\mu\text{g}$  de QS21. Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos. Luego se añadió StxB-OVA hasta alcanzar una concentración final de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Quince minutos más tarde, se verificó el pH y se ajustó cuando fue necesario a 6.8 +/- 0.1 con NaOH o con HCl. El volumen de inyección de 25  $\mu\text{l}$  correspondió a 1  $\mu\text{g}$  de STxB-Ova, 5 $\mu\text{g}$  de ambos inmunoestimulantes y 12.5  $\mu\text{L}$  de emulsión.

**1.4.6 Sistema adyuvante F: 3D-MPL y QS21 en una emulsión de aceite en agua.**

La emulsión de aceite en agua fue como la del ejemplo 1.3 añadiendo el colesterol a la fase orgánica hasta alcanzar una composición final de 1% de escualeno, 1% de tocoferol, 0.4% de Tween 80, y 0.05% de colesterol. Después de la formación de la

emulsión, se le añadió 3 D-MPL hasta alcanzar una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Luego se le añadió QS21 hasta alcanzar una concentración final de 100  $\mu\text{g}$  por mL. Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos.

- 5 Después se añadió StxB-OVA hasta alcanzar una concentración final de 40  $\mu\text{g/mL}$ . Quince minutos más tarde, se verificó el pH y se ajustó cuando fue necesario a 6.8  $\pm$  0.1 con NaOH o HCl. El volumen de inyección de 25  $\mu\text{L}$  correspondió a 1  $\mu\text{g}$  de STxB-Ova, 2.5  $\mu\text{g}$  de 3 D-MPL y QS21, 2.5  $\mu\text{l}$  de emulsión.

10 **1.4.7 Sistema adyuvante G: CpG2006**

Se añadió CpG estéril en bruto a una solución de PBS o de NaCl 150 mM hasta alcanzar una concentración final de 100 o 200  $\mu\text{g/mL}$ .

- 15 Luego se añadió StxB-OVA hasta alcanzar una concentración final de 10 o 20  $\mu\text{g/mL}$ . El CpG usado fue un 24-mero con la siguiente secuencia 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3' (Seq ID No.4). Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos. Se verificó el pH y se ajustó cuando fue necesario a 6.1  $\pm$  0.1 con NaOH o con HCl.

- 20 El volumen de inyección de 50  $\mu\text{l}$  correspondió a 0.5  $\mu\text{g}$  de STxB-Ova y 5  $\mu\text{g}$  de CpG (figuras 12A, 12B y 21 ). Los experimentos se realizaron con volúmenes de inyección de 25  $\mu\text{l}$  (correspondientes a 0.5  $\mu\text{g}$  de STxB-Ova y 5  $\mu\text{g}$  de CpG). No se muestran los resultados, pero fueron comparables.

25 **1.4.8 Sistema adyuvante H: QS21, 3D-MPL y CpG2006**

Se añadió CpG estéril en bruto a una solución de PBS hasta alcanzar una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$ . La composición de la PBS fue  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 9 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 48 mM; NaCl: 100 mM, con pH de 6.1. Luego se añadió StxB-OVA hasta alcanzar una  
5 concentración final de 20  $\mu\text{g/mL}$ . Finalmente, se añadió QS21 y 3 D-MPL como una premezcla de SUV estéril en bruto que contenía 3 D-MPL y QS21, a la cual se hace referencia como DQMPLin hasta alcanzar concentraciones finales de 3D-MPL y QS21 de 10  $\mu\text{g/mL}$ .

El CpG usado fue un 24-mero con la siguiente secuencia: 5'-  
10 TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3' (Seq ID No.4). Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos. Se verificó el pH y se ajustó cuando fue necesario a 6.1  $\pm$  0.1 con NaOH o con HCl.

El volumen de inyección de 50  $\mu\text{L}$  correspondió a 1  $\mu\text{g}$  de  
15 STxB-Ova, 0.5  $\mu\text{g}$  de 3 D-MPL y QS21 y 5  $\mu\text{g}$  de CpG. Luego se diluyó esta formulación en una solución de 3D-MPL/QS21 y CpG (en una concentración de 10, 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente) para obtener dosis de 0.2, 0.04 y 0.008  $\mu\text{g}$  de StxB-OVA. (Estas formulaciones usadas para experimentos se muestran en las figuras  
20 1 hasta 10 y 13).

En el experimento se muestra en las figuras 12 A y 12B, que CpG tuvo una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ , 3D-MPL y QS21 una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  y StxB-OVA en una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ . El volumen de inyección de 50  $\mu\text{L}$  correspondió a 0.5  $\mu\text{g}$  de  
25 StxB-OVA, 0.5  $\mu\text{g}$  de 3D-MPL y QS21 y 5  $\mu\text{g}$  de CpG. En un

experimento adicional, CpG tuvo una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , 3D-MPL y QS21 en una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  y StxB-OVA en una concentración de 40  $\mu\text{g/mL}$ . El volumen de inyección de 25  $\mu\text{l}$  correspondió a 1  $\mu\text{g}$  de StxB-OVA, 2.5  $\mu\text{g}$  de 3D-MPL y QS21 y 25  $\mu\text{g}$  de CpG. No se muestran los resultados de este experimento, pero son comparables con los resultados observados con otras concentraciones de componentes.

#### **1.4.9 Sistema adyuvante I: QS21 y CpG2006**

Se añadió CpG estéril en bruto a una solución de PBS o de NaCl 150 mM hasta alcanzar una concentración final de 100 o 200  $\mu\text{g/mL}$ . La composición de PBS fue:  $\text{PO}_4$  10 mM, NaCl 150 mM pH 7.4 o  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 9 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 48 mM; NaCl: 100 mM pH 6.1. Luego se añadió StxB-OVA hasta alcanzar una concentración final de 10 o 20  $\mu\text{g/mL}$ . Finalmente, se le añadió QS21 como una premezcla de SUV estéril en bruto y QS21 (a la cual se hace referencia como DQ, preparada como en el ejemplo 1.3.14) hasta alcanzar una concentración final de QS21 de 10 o 20  $\mu\text{g/mL}$ .

El CpG usado fue un 24-mero con la siguiente secuencia 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3' (Seq ID No.4). Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos. Se verificó el pH y se ajustó cuando fue necesario a 6.1 o 7.4  $\pm$  0.1 con NaOH o con HCl. Volúmenes de inyección de 50  $\mu\text{l}$  correspondieron a 0.5  $\mu\text{g}$  de STxB-Ova, 0.5  $\mu\text{g}$  de QS21 y 5  $\mu\text{g}$  de CpG (figuras 12 A y 12B).

También se realizaron experimentos con volúmenes de

Inyección de 25  $\mu$ L (correspondientes a 0.5  $\mu$ g de STxB-Ova, 0.5  $\mu$ g de QS21 y 5 $\mu$ g de CpG). No se muestran los resultados, pero fueron comparables.

#### 5 1.4.10 Sistema adyuvante J: Adyuvante de Freund incompleto (IFA)

Se obtuvo IFA en CALBIOCHEM. Se emulsificó el IFA con un antígeno usando el vórtex durante un minuto. Se diluyó STxB-ova hasta una concentración de 40  $\mu$ g/mL en PBS, con un pH de 6.8 o 7.4 y se mezcló con 500  $\mu$ l/mL de IFA, ya sea usado como tal o  
 10 después de una dilución de 20 veces en PBS. El volumen de inyección de 25  $\mu$ L correspondió a 1  $\mu$ g de STxB-ova y 12.5 o 0.625  $\mu$ l de IFA (se muestra en la figura 14). En otros experimentos, StxB-OVA se diluyó a 10  $\mu$ g/mL en PBS, con un pH de 6.8 o 7.4 y se mezcló con 500 o 250  $\mu$ l/mL de IFA. El volumen de inyección de 50  
 15  $\mu$ L correspondió a 0.5  $\mu$ g de StxB-OVA y 12.5 o 25  $\mu$ L de IFA. Estos experimentos dieron resultados comparables a los que se muestran en la figura 14.

#### 1.4.11 Sistema adyuvante K: emulsión de aceite en agua 1.4.11.1

Se preparó sistema adyuvante K1 estéril en bruto como en el  
 20 ejemplo 1.3 excepto porque 3D-MPL y QS21 se omitieron.

El volumen de inyección de 25  $\mu$ L correspondió a 1  $\mu$ g de StxB-OVA y 12.5  $\mu$ l de emulsión.

Los resultados se muestran como sistema adyuvante K en la figura 16.

#### 25 1.4.11.2 Sistema adyuvante K2

Se preparó emulsión estéril en bruto tal como en el sistema adyuvante F, excepto porque 3D-MPL y QS21 se omitieron.

El volumen de inyección de 25  $\mu$ L correspondió a 1  $\mu$ g de StxB-OVA y 2.5  $\mu$ l de emulsión que contenía colesterol.

- 5 No se muestran los resultados, pero fueron comparables a los observados con sistema adyuvante K1.

#### **1.4.12 Sistema adyuvante L: Poli I:C**

- El Poli I:C (ácido polinosínico-policitídílico) es un imitador sintético de ARN viral de Amersham. En algunos experimentos, se diluyó StxB-OVA en NaCl 150 mM hasta alcanzar una concentración final de 20  $\mu$ g/mL. Luego se le añadió Poli I:C estéril en bruto hasta alcanzar una concentración final de 20  $\mu$ g/mL.
- 10

Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos.

- 15 El volumen de inyección de 25  $\mu$ l correspondió a 0.5  $\mu$ g de STxB-Ova y 0.5  $\mu$ g de Poli I:C (se muestran en las figuras 15 y 21).

En otros experimentos, StxB-OVA tuvo una concentración de 10  $\mu$ g/mL y Poli I:C una concentración de 20 o 100  $\mu$ g/mL.

- El volumen de inyección de 50  $\mu$ L correspondió a 0.5  $\mu$ g StxB-OVA y 1 o 5  $\mu$ g de Poli I:C.
- 20

Estos experimentos dieron resultados comparables a los que se muestran en las figuras 15 y 21.

#### **1.4.13 Sistema adyuvante M: CpG5456**

- Se diluyó StxB-OVA en NaCl 150 mM hasta alcanzar una concentración final de 20  $\mu$ g/mL. Luego se le añadió CpG estéril en
- 25

bruto hasta alcanzar una concentración final de 200  $\mu\text{g/mL}$ .

El CpG usado fue un 22-mero con la secuencia 5'- TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G-3' (CpG 5456). Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos.

- 5 El volumen de inyección de 25  $\mu\text{L}$  correspondió a 0.5  $\mu\text{g}$  de STxB-Ova y 5  $\mu\text{g}$  de CpG.

#### **1.4.14 Sistema adyuvante N: QS21 y Pol I:C**

- Una mezcla de lípido (tal como fosfatidilcolina, ya sea de clara de huevo o sintética) y colesterol en solvente orgánico, se  
10 secó al vacío (o alternativamente bajo una corriente de gas inerte). Una solución acuosa (tal como salina fosfatada regulada) se añadió entonces, y se agitó el recipiente hasta que todo el lípido estaba en suspensión. Esta suspensión fue microfluidizada luego hasta que el tamaño del liposoma fue reducido a aproximadamente 100 nm, y  
15 luego se filtró de manera estéril a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ . La extrusión o la sonicación podrían reemplazar este paso.

Típicamente, la proporción colesterol:fosfatidilcolina fue de 1:4 (p/p), y luego se añadió la solución acuosa para dar una concentración final de colesterol de 5 hasta 50 mg/mL.

- 20 Los liposomas tienen un tamaño definido de 100 nm y se hace referencia a ellos como SUV (por small unilamellar vesicles, vesículas unilaminares pequeñas). Los liposomas por sí solos son estables en el tiempo y no tienen capacidad fusógena.

- Se le añadió SUV estéril en bruto a PBS hasta alcanzar una  
25 concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$  de MPL. Se le añadió QS21 en

solución acuosa se añadió a la SUV hasta alcanzar una concentración final de QS21 de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Esta mezcla de liposoma y QS21 es a la cual se hace referencia como DQ.

Se diluyó Poli I:C estéril en bruto (Amersham, como  
5 anteriormente) en NaCl 150 mM, hasta alcanzar una concentración  
final de 20  $\mu\text{g/mL}$  antes de añadir DQ hasta alcanzar una  
concentración final de 20  $\mu\text{g/mL}$  en QS21. Luego se añadió StxB-  
OVA hasta alcanzar una concentración final de 20  $\mu\text{g/mL}$ . Entre  
cada adición de componente, el producto intermedio se agitó  
10 durante 5 minutos.

El volumen de inyección de 25  $\mu\text{L}$  correspondió a 0.5  $\mu\text{g}$  de  
STxB-Ova, 0.5  $\mu\text{g}$  de QS21 y 0.5  $\mu\text{g}$  de Poli I:C.

#### **1.4.15 Sistema adyuvante O: CpG2006 y emulsión de aceite en agua.**

15 Se preparó emulsión de aceite en agua tal como en el ejemplo  
1.3.

Se le añadió emulsión estéril en bruto a PBS hasta alcanzar  
una concentración final de 500  $\mu\text{L}$  de emulsión por mL (v/v). Luego  
se añadió CpG hasta alcanzar una concentración final de 200  $\mu\text{g/mL}$ .  
20 Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó  
durante 5 minutos. Luego se añadió StxB-OVA hasta alcanzar una  
concentración final de 20  $\mu\text{g/mL}$ . Quince minutos más tarde, se  
verificó el pH y se ajustó cuando fue necesario a 6.8 +/- 0.1 con  
NaOH o con HCl.

25 El CpG usado fue un 24-mero con la siguiente secuencia: 5'-

TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3' (Seq ID No.4). El volumen de inyección de 25  $\mu$ L correspondió a 0.5  $\mu$ g de STxB-Ova, 5  $\mu$ g de CpG y 12.5  $\mu$ L de emulsión.

#### **1.4.16 Sistema adyuvante P: CpG2006 y emulsión de aceite en**

##### **5 agua**

Se preparó una emulsión de aceite en agua siguiendo la receta publicada en el folleto de instrucciones contenido en la vacuna Chiron Behring FluAd.

Se preparó un regulador citrato mezclando 36.67 mg de ácido cítrico con 627.4mg de citrato de Na.2H<sub>2</sub>O en 200 mL de H<sub>2</sub>O. Por separado, se mezclaron 3.9 g de escualeno y 470 mg de Span 85 bajo agitación magnética.

Se mezcló 470 mg de Tween 80, con el regulador citrato. Se le añadió la mezcla resultante a la mezcla de escualeno/Span 85 y se mezcló "vigorosamente" con agitación magnética. El volumen final fue de 100 ml.

Luego se colocó la mezcla en el microfluidizador M110S (de Microfluidics) para reducir el tamaño de las gotitas de aceite. Se obtuvo una media promedio de  $z$  de 145 nm con una polidispersidad de 0.06. Este tamaño se obtuvo en el Zetasizer 3000HS (de Malvern) usando las siguientes condiciones técnicas:

- longitud de onda láser: 532 nm (Zeta3000HS).
- potencia de láser: 50 mW (Zeta3000HS).
- dispersión de luz detectada a 90° (Zeta3000HS).
- temperatura: 25°C.

25

- duración: determinación automática mediante el software.
- cantidad: 3 mediciones consecutivas.
- diámetro promedio z: mediante análisis de acumulados.

Se añadió solución resultante estéril en bruto a PBS hasta  
5 alcanzar una concentración final de 500  $\mu$ l de emulsión por mL  
(v/v). Luego se añadió CpG hasta alcanzar una concentración final  
de 200  $\mu$ g/mL. Entre cada adición de componente, el producto  
intermedio se agitó durante 5 minutos. Luego se añadió StxB-OVA  
hasta alcanzar una concentración final de 20  $\mu$ g/mL. Quince minutos  
10 más tarde, se verificó el pH y se ajustó cuando fue necesario a 6.8  
+/- 0.1 con NaOH o con HCl.

El CpG usado fue un 24-mero con la siguiente secuencia 5'-  
TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3' (Seq ID No.4).

El volumen de inyección de 25  $\mu$ L correspondió a 0.5  $\mu$ g de  
15 STxB-Ova, 5  $\mu$ g de CpG y 12.5  $\mu$ L de emulsión.

#### **1.4.17 Sistema adyuvante Q: CpG2006 y emulsión de agua en aceite de IFA**

Se le añadió IFA, obtenida de CALBIOCHEM, se añadió a PBS  
hasta alcanzar una concentración final de 500  $\mu$ L de emulsión por  
20 mL (v/v). CpG se añadió entonces hasta alcanzar una concentración  
final de 200  $\mu$ g/mL. Entre cada adición de componente, el producto  
intermedio se agitó durante 5 minutos. Luego se añadió StxB-OVA  
hasta alcanzar una concentración final de 20  $\mu$ g/mL. Quince minutos  
más tarde, se verificó el pH y se ajustó cuando fue necesario a 7.4  
25 +/- 0.1 con NaOH o con HCl.

El CpG usado fue un 24-mero con la siguiente secuencia 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3' (Seq ID No.4).

El volumen de inyección de 25  $\mu$ L correspondió a 0.5  $\mu$ g de STxB-Ova y 5  $\mu$ g de CpG, 12.5  $\mu$ l de emulsión.

#### 5 **1.4.18 Sistema adyuvante R: CpG2006 y Al(OH)<sub>3</sub>**

Se diluyó Al(OH)<sub>3</sub> de Brentag hasta una concentración final de 1 mg/mL (Al+++ ) en agua para inyección. La STxB-OVA fue adsorbida en Al+++ en una concentración de 20  $\mu$ g/mL durante 30 minutos. Se le añadió CpG hasta alcanzar una concentración de 200  
10  $\mu$ g/mL y se incubó durante 30 minutos antes de añadir NaCl hasta alcanzar una concentración final de 150 mM. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente bajo agitación orbital.

El CpG usado fue un 24-mero con la siguiente secuencia: 5'-  
15 TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3' (Seq ID No.4).

El volumen de inyección de 25  $\mu$ L correspondió a 0.5  $\mu$ g de STxB-Ova, 5  $\mu$ g de CpG y 25  $\mu$ g de Al+++.

#### **1.4.19 Sistema adyuvante S: CpG2006 y AlPO<sub>4</sub>**

Se diluyó AlPO<sub>4</sub> de Brentag hasta una concentración final de  
20 1 mg/mL (Al+++ ) en agua para inyección. La STxB-OVA fue adsorbida en Al+++ en una concentración de 20  $\mu$ g/mL durante 30 minutos. Se le añadió CpG hasta alcanzar una concentración de 200  $\mu$ g/mL y se incubó durante 30 minutos antes de añadir NaCl hasta  
25 alcanzar una concentración final de 150 mM. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente bajo agitación

orbital.

El CpG usado fue un 24-mero con la siguiente secuencia: 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3' (Seq ID No.4).

El volumen de inyección de 25  $\mu$ l correspondió a 0.5  $\mu$ g de STxB-Ova, 5  $\mu$ g de CpG y 25  $\mu$ g de Al+++.

#### **1.4.20 Sistema adyuvante T: 3D-MPL y Al(OH)3**

Se diluyó Al(OH)3 de Brentag hasta una concentración final de 1 mg/mL (Al+++ ) en agua para inyección. La StxB-OVA fue adsorbida en Al+++ en una concentración de 40 o 20  $\mu$ g/mL durante un periodo de 30 minutos. Se le añadió 3D-MPL hasta alcanzar una concentración de 100  $\mu$ g/mL y se incubó durante 30 minutos antes de añadir NaCl para alcanzar una concentración final de 150 mM. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente bajo agitación orbital.

El volumen de inyección de 25  $\mu$ L correspondió a 1 o 0.5  $\mu$ g de STxB-Ova, 2.5  $\mu$ g de 3D- MPL y 25  $\mu$ g de Al+++ . Los resultados para 1  $\mu$ g de STxB-Ova se muestran en la figura 16. Los experimentos en donde se inyectó 0.5  $\mu$ g de STxB-Ova no se muestran, pero dieron resultados comparables a los que se muestran en la figura 16.

#### **1.4.21 Sistema adyuvante U: Ligando TLR2**

El ligando TLR2 usado fue un Pam3CysSerLys4 sintético, un lipopéptido bacterial adquirido en Microcollections, el cual se sabe que es específico para TLR2. Se diluyó StxB-OVA en NaCl 150 mM o en PBS con pH 7.4 hasta alcanzar una concentración final de 10 o

20  $\mu\text{g/mL}$ . Luego se le añadió Pam3CysSerLys4 estéril en bruto hasta alcanzar una concentración final de 40, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$ . Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos.

5 El volumen de inyección de 50  $\mu\text{L}$  correspondió a 0.5  $\mu\text{g}$  de STxB-Ova y a 5 o 10  $\mu\text{g}$  de Pam3CysSerLys4. (Los resultados para 5  $\mu\text{g}$  se muestran en la figura 21, véase la sección 3.2.9 para la discusión de los resultados con otras dosis de TLR2).

En otros experimentos, el volumen de inyección de 25  $\mu\text{L}$  correspondió a 0.5  $\mu\text{g}$  de StxB-OVA y a 1  $\mu\text{g}$  de Pam3CysSerLys4.

#### **1.4.22 Sistema adyuvante V: ligando TLR7/8.**

El ligando TLR 7/8 usado fue un derivado de Imiquimod conocido como resiquimod o R-848 (Cayla). El R-848 es un compuesto de bajo peso molecular de la familia imidazoquinolina que tiene potentes propiedades anti-virales y anti-tumorales en modelos animales. La actividad del imiquimod es mediada predominantemente por la inducción de citocina, incluyendo IFN- $\alpha$  e IL-12. El R-848 es un análogo más potente de imiquimod (Akira, S. y Hemmi, H.; IMMUNOLOGY LETTER, 85, (2003), 85-95).

20 Se diluyó STxB-OVA en PBS con pH de 7.4 hasta alcanzar una concentración final de 10 o 20  $\mu\text{g/mL}$ . Luego se le añadió R-848 estéril en bruto hasta alcanzar una concentración final de 20 y 100  $\mu\text{g/mL}$ . Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos.

25 El volumen de inyección de 50  $\mu\text{L}$  correspondió a 0.5  $\mu\text{g}$  de

STxB-Ova y a 1 o 5  $\mu\text{g}$  de R- 848. En otro experimento, el volumen de inyección de 25  $\mu\text{L}$  correspondió a 0.5  $\mu\text{g}$  de STxB- OVA y 0.5  $\mu\text{g}$  de R-848.

#### 1.4.22 Sistema adyuvante W: AIPO4.

##### 5 1.4.22.1 Sistema adyuvante W1

Se diluyó AIPO4 de Brentag hasta una concentración final de 0.5 mg/mL (Al+++ ) en agua para inyección. La STxB-OVA fue adsorbida en Al+++ en una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 30 minutos antes de añadir NaCl hasta alcanzar una concentración final de sal de 150 mM. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente bajo agitación orbital. El volumen de inyección de 50  $\mu\text{l}$  correspondió a 0.5  $\mu\text{g}$  de STxB-Ova y 25  $\mu\text{g}$  de Al+++.

##### 1.4.22.2 Sistema adyuvante W2

15 Se diluyó AIPO4 de Brentag en PBS con pH de 7.4 hasta una concentración final de 0.5 mg/mL (Al+++). Se adsorbió STxB-OVA en Al+++ en una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 30 minutos. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente bajo agitación orbital. El volumen de inyección de 50  $\mu\text{L}$  correspondió a

20 0.5  $\mu\text{g}$  de STxB-Ova, 5  $\mu\text{g}$  de CpG y 25  $\mu\text{g}$  de Al+++ . El examen mediante SDS-PAGE tal como se establece en XXXXX indicó que aproximadamente 70% del antígeno no fue adsorbido en el AIPO4

#### 1.5 Determinación del nivel de antígeno adsorbido en un complejo antígeno/sal metálica

25 La formulación de interés se centrifuga durante 6 min a 6500

g. Una muestra del supernadante resultante se desnaturaliza durante 5 minutos a 95 °C, y se carga sobre un gel para SDS-PAGE en regulador para reducción de muestra. También se carga una muestra del antígeno sin adyuvante. Luego se corre el gel a 200V, 200 mA durante 1 hora. Después se tñe el gel con plata de acuerdo con el método Daichi. Los niveles de antígeno libre en la formulación se determinan comparando la muestra de la formulación que tiene adyuvante, con el antígeno sin adyuvante. También se puede usar otras técnicas que son bien conocidas en la materia, tales como detección Western.

**Ejemplo 2. Vacunación de ratones C57/B6 con vacunas de la Invención.**

Se usaron diversas formulaciones tal como se describió anteriormente para vacunar ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad C57BL/B6 (10/grupo). Los ratones recibieron una o dos inyecciones con una separación de 14 días entre cada una, y se les extrajo sangre en las semanas 1, 2, 3 y 8 (para ver los días reales véase los ejemplos específicos). Se vacunó a los ratones intramuscularmente (inyección en el músculo gastrocnemio izquierdo de un volumen final de 25  $\mu$ L o de 50  $\mu$ L). El adenovirus recombinante con ovalbúmina fue inyectado en una dosis que varió desde  $5 \times 10^7$  hasta  $10^8$  VP.

Se realizó estimulación ex -vivo de PBL en medio completo que es RPMI 1640 (Biowitaker) complementado con 5% de FCS (Harlan, Holland), 1  $\mu$ g/mL de cada uno de los anticuerpos anti-ratón

CD49d y CD28 (BD, Biosciences), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 10  $\mu\text{g/mL}$  de sulfato de estreptamicina, 10 unidades/mL de penicilina G sódica (Gibco), 10  $\mu\text{g/mL}$  de estreptamicina, 50  $\mu\text{M}$  de B-ME mercaptoetanol y 100X de aminoácidos no esenciales diluidos, todos estos aditivos son de Gibco Life Technologies. Las estimulaciones de péptido se realizaron siempre a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

## **2.1 Análisis Immunológicos :**

### **2.1.1 Detección de células T específicas para el antígeno**

10        Aislamiento de PBL y tinción de tetrámero. Se extrajo sangre de la vena retro orbital (50  $\mu\text{L}$  por ratón, 10 ratones por grupo) y se diluyó directamente en medio RPMI + heparina (LEO). Se aislaron PBL mediante un gradiente Ilfoprep (CEDERLANE). Luego se lavaron las células, se contaron y finalmente se resuspendió de 1 a 15 5  $10^5$  células en 50  $\mu\text{L}$  de regulador FACS (PBS, FCS 1%, 0.002% de NaN<sub>3</sub>) que contenía anticuerpo CD16/CD32 (BD Biosciences) en una concentración final (f.c.) de 1/50. Después de 10 min., se le añadió 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de tetrámeros se añadió a la suspensión de células. La mezcla de tetrámeros contenía 0.2  $\mu\text{L}$  o 1  $\mu\text{L}$  de 20 tetrámero sIlfekl H2Kb - PE respectivamente de Immunosource o Immunomics Coulter, de acuerdo con la disponibilidad. También se añadieron anticuerpos anti-CD8a-PerCP (1/100 f.c.) y anti-CD4-APC (1/200 f.c.) (BD Biosciences) en la prueba. Luego se dejaron las células ya sea durante 45 minutos a temperatura ambiente (para 25 el tetrámero de Immunosource) o 10 minutos a 370 °C (para el

tetrámero de Immunomics Coulter) antes de ser lavado una vez y analizado usando un FACS Calibur™ con el software CELLQuest™.

### **2.1.2 Tinción con citocina Intracelular (ICS).**

Se realizó ICS en muestras de sangre tomadas como se describe en el párrafo 2.1.1. Se resuspendieron de 5 a 10  $10^5$  PBL en medio completo complementado o no ya sea con 1  $\mu\text{g/mL}$  de péptido siinfekl o con un grupo de 17 péptidos Ova 15-meros (11 péptidos restringidos por NHC de clase I y 6 péptidos restringidos por MHC de clase II), presentes en una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$  cada uno. Después de 2 horas, se le añadió 1  $\mu\text{g/mL}$  de Brefeldin-A (BD, Biosciences) durante 16 horas y se recolectaron las células después de un total de 18 horas. Se lavaron las células una vez y luego se tiñeron con anticuerpos anti-ratón, todos adquiridos en BD, Biosciences; todos los pasos adicionales se realizaron sobre hielo. Primero se incubaron las células durante 10 min. en 50  $\mu\text{L}$  de solución de CD16/32 (1/50 f.c, regulador FACS). Se le añadió 50  $\mu\text{L}$  de mezcla marcadora superficial de células T (1/100 CD8a por Cp, 1/100 CD4 PE) y se incubaron las células durante 20 min. antes de ser lavadas. SE fijaron las células y se permeabilizaron en 200  $\mu\text{L}$  de solución perm/fix (BD, Biosciences), se lavaron una vez en perm/regulador para lavado (BD, Biosciences) antes de ser teñidas a 4°C con anti IFN $\gamma$ -APC y anti IL2-FITC, ya sea durante 2 horas o durante la noche . Se analizaron los datos usando un FACS Calibur™ con software CELLQuest™. En la figura 14B, el anticuerpo anti-CD4 fue marcado con APC Cy7, el anti-CD8 fue marcado con

PercP Cy5.5, y se incluyó un anticuerpo anti-TNF $\alpha$ -PE en el paso de tinción con citocina.

### **2.1.3 Actividad citotóxica mediada por células, detectada *in vivo* (CMC *in vivo*).**

5        Para evaluar la citotoxicidad específica para siinfekl, se  
inyectó a los ratones inmunizados y a los ratones de control una  
mezcla de objetivos que consistía en 2 poblaciones de esplenocitos  
y nodos linfáticos singénicos marcados diferencialmente con CFSE,  
cargados o no con 1 nM de péptido siinfekl. Para la marcación  
10 diferencia, se usó éster de succinidimil carboxifluoresceína (CFSE;  
Molecular Probes - Palmoski *et al.* ; 2002, J. Immunol. 168, 4391-  
4398) en una concentración de 0.2  $\mu$ M o 2.5  $\mu$ M. Ambos tipos de  
objetivos fueron agrupados en una proporción de 1/1 y re-  
suspendidos en una concentración de  $10^8$  objetivos/mL. Se inyectó  
15 200  $\mu$ L de mezcla objetivo por ratón en la vena de la cola 15 días  
después de la primera inyección. Se evaluó la citotoxicidad  
mediante análisis FACS en cualquier drenaje de nodo linfático o  
sangre (vena yugular) tomada del animal sacrificado en diferentes  
momentos (4 h, 18 h o 24 h después de la inyección objetivo). Se  
20 calculó el porcentaje medio de lisis en células objetivo cargadas  
con siinfekl con relación a los controles negativos al antígeno con la  
siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis} = 100 - \frac{(\text{objetivo corregido (+)} \times 100)}{\text{objetivo de control (-)}}$$

25         $\text{Objetivo corregido +} = \text{objetivo +} \times \text{(preiny.-)}$

(prelny.+)

Células objetivo pre-inyectadas = mezcla de objetivos pulsados con péptido (prelny.+) y no pulsados (prelny.-) adquiridos mediante FACS antes de la inyección *in vivo*.

Objetivo corregido (+) = cantidad de objetivos pulsados con péptido adquirida mediante FACS después de la inyección *in vivo*, corregida con el fin de tomar en cuenta la cantidad de células prelny+ en la mezcla preinyectada (véase lo anterior).

#### 2.1.4 Título de anticuerpo específico para Ag (análisis individual de IgG total): ELISA.

Se evaluó el análisis serológico 15 días y 40 días después de la segunda inyección. Se les extrajo sangre a los ratones (10 por grupo) mediante punción retro-orbital. Se midieron las IgG totales anti-Ova mediante ELISA. Se recubrieron placas de 96 receptáculos (NUNC, placas Inmunosorbentes) con antígeno durante la noche a 40 °C (50 µL por receptáculo de solución Ova (ova 10 µg/mL, PBS). Las placas se lavaron luego en regulador para lavado (PBS / 0.1% de Tween 20 (Merck)) y se saturaron con 100 µL de regulador para saturación (PBS / 0.1% de Tween 20 / 1% de BSA / 10% de FCS) durante 1 hora a 37°C. Después de 3 lavados adicionales en el regulador para lavado, se añadió 100 µL de suero de ratón diluido y se incubó durante 90 minutos a 37°C. Después de otros tres lavados, se incubaron las placas durante otra hora a 37°C con IgG total anti-ratón biotinilada diluida 1000 veces en regulador

para saturación. Después de la saturación, se lavaron las placas de 96 receptáculos nuevamente, tal como se describió anteriormente. Se les añadió una solución de estreptavidina peroxidasa (Amersham) diluida 1000 veces en regulador para saturación, 50  $\mu$ L por receptáculo. El último lavado fue un lavado de 5 pasos en regulador para lavado. Finalmente, se añadió 50  $\mu$ L de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina en regulador ácido - la concentración de  $H_2O_2$  es de 0.01% - BIORAD) por receptáculo y las placas se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos. Para detener la reacción, se añadió 50  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  0.4 N por receptáculo. Se leyó la absorbancia en una longitud de onda de 450/630 nm mediante un lector de placa para ELISA de BIORAD. Se calcularon los resultados usando el software softmax-pro.

#### **2.1.5 Ellspot de células B**

Se recolectaron células de bazo y de médula ósea 78 días después de la segunda inyección y se cultivaron a 37 °C durante cinco días en medio completo complementado con 3  $\mu$ g/mL de CpG 2006 y 50 U/mL de rIL-2 para provocar que las células B de recuerdo se diferenciaron en células plasmáticas secretoras de anticuerpo. Después de cinco días, se incubaron placas de 96 receptáculos con filtro con etanol al 70% durante 10 minutos, se lavaron y se recubrieron con ovalbúmina (50  $\mu$ g/mL) o con un antisuero Ig anti-ratón de cabra. Luego se saturaron con medio completo. Se recolectaron las células, se lavaron y se colocaron en las placas a  $2 \times 10^6$  células/receptáculo durante una hora a 37°C.

Las placas se almacenaron entonces durante la noche a 40 °C. El día siguiente, se desecharon las células lavando las placas con PBS Tween 20 al 0.1%. Luego se incubaron los receptáculos a 37°C durante una hora con un anticuerpo anti-IgG biotinilado diluido en 1/500 PBS, se lavaron y se incubaron durante una hora con extravidina-peroxidasa de rábano picante (4 µg/mL). Después de un paso de lavado, se revelaron las manchas mediante una incubación de 10 minutos con una solución de amino-etil-carbazol (AEC) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se fijaron lavando las placas con agua del chorro. Cada célula que ha secretado IgG o IgG específica para Ova aparece como un punto rojo. Los resultados están expresados como frecuencia de puntos de IgG específica para Ova por cada 100 puntos de IgG totales.

### **3. Resultados**

Los resultados que se describen más adelante muestran que la eficiencia del sistema STxB para inducir respuestas de CD8 fue mejorada drásticamente combinándolo con diversos sistemas adyuvantes o con algunos de sus componentes.

#### **3.1 Datos con sistemas de adyuvante A y H**

##### **3.1.1 Evaluación de la respuesta primaria con AS A y AS H**

Los resultados obtenidos muestran que dosis bajas (0.2 µg) de inmunización con STxB-ova en la ausencia de adyuvante no inducen una respuesta inmunitaria fuerte de células T CD8 que se pueda detectar ex-vivo. En contraste, se observa una fuerte respuesta inmunitaria cuando se combina STXB-OVA con cualquier

sistema adyuvante A o H. Adicionalmente, se demuestra una clara ventaja sobre la proteína con adyuvante.

La STxB-ova auxiliada con sistema adyuvante A o H es potente para inducir una respuesta primaria fuerte y persistente. Ésta induce una alta frecuencia de células T CD8 específicas para el antígeno (Figura 1 - las inyecciones incluyeron 0.2  $\mu$ g de STxB-OVA, 0.5  $\mu$ g de 3D-MPL y QS21, y 5  $\mu$ g de CPG para AS H. Los métodos se llevaron a cabo tal como se describe en 2.1.1 anteriormente, se le extrajo sangre a los ratones 7 días después de la primera inyección). Además, la Figura 2 (las inyecciones incluyeron 0.2  $\mu$ g de STxB-OVA, 0.5  $\mu$ g de 3D-MPL y QS21, y 5  $\mu$ g CPG para AS H. Los métodos se llevaron a cabo tal como se describe en 2.1.1 anteriormente, se le extrajo sangre a los ratones 14 días después de la primera inyección) muestra que esta respuesta de CD8 específica para siinfekl todavía aumenta entre el día 7 y el día 14 después de la inyección. Esto no se observa con la vacunación con la proteína auxiliada, pero es característica preferible de la respuesta primaria inducida por un vector vivo tal como adenovirus. Las células T CD8 son células T efectoras fácilmente diferenciadas, las cuales producen IFN $\gamma$ , mientras que la estimulación se realiza con el péptido inmunodominantes o con una agrupación de péptidos Ova (se muestran respectivamente en las figuras 3 y 4, las inyecciones incluyeron 0.2  $\mu$ g de STxB-OVA1 0.5  $\mu$ g de 3D-MPL y QS21, y 5  $\mu$ g de CPG para AS H. Los métodos fueron llevados a cabo tal como se describe en 2.1.2 anteriormente,

se le extrajo sangre a los ratones 14 días después de la primera inyección). La frecuencia mayor observada de las células T CD8 respondedoras con la estimulación con el grupo de péptidos indica que el repertorio de células T CD8 primarias no está limitado al epítipo inmunodominante de clase I. Además, se puede detectar alta actividad citotóxica *in vivo* solamente cuando STxB-ova está auxiliado (Figura 5 - las inyecciones incluyeron 0.2  $\mu$ g de STxB-OVA, 0.5  $\mu$ g de 3D-MPL y QS21, y 5 $\mu$ g CPG para AS H. Los métodos fueron llevados a cabo tal como se describe en 2.1.3 anteriormente a las 18 horas después de la inyección objetivo). Finalmente la respuesta primaria inducida por STxB-ova auxiliada por AS H es fuertemente persistente, tal como se ilustra en la figura 6B (las inyecciones incluyeron 0.2  $\mu$ g de STxB-OVA, 0.5  $\mu$ g de 3D-MPL y QS21, y 5  $\mu$ g de CPG. Los métodos fueron llevados a cabo tal como se describen en 2.1.1 anteriormente, se le extrajo sangre a los ratones en diferentes momentos).

### **3.1.2 Evaluación de la respuesta secundaria con AS A y AS H**

La combinación del sistema de suministro de la toxina STxB con adyuvantes potentes, también mejora la amplitud y persistencia de la respuesta inmunológica secundaria. Esto se ejemplifica mejor evaluando la respuesta 47 días después del refuerzo. De manera importante, la alta respuesta de CD8 inducida por STxB-OVA auxiliado es de intensidad y persistencia similar a la inducida por una estrategia de refuerzo con sensibilizador adenovirus recombinante/proteína con adyuvante (Figura 6A- las inyecciones

Incluyeron 0.2  $\mu$ g de STxB-OVA, 0.5  $\mu$ g de 3D- MPL y QS21, y 5 $\mu$ g CPG para AS H. Los métodos fueron llevados a cabo tal como se describen en 2.1.1 anteriormente, se sacó sangre a los ratones 47 días después de la segunda inyección). Con respecto a la población de células T efectoras, todavía se detectan células T productoras tanto en compartimientos de células T CD4 como CD8 (Figura 7 y 8 - las inyecciones incluyeron 0.2  $\mu$ g de STxB-OVA, 0.5  $\mu$ g de 3D-MPL y QS21, y 5 $\mu$ g de CPG para AS H. Los métodos fueron llevados a cabo tal como se describen en 2.1.2 anteriormente, se le extrajo sangre a los ratones 47 días después de la segunda inyección. Las PBL fueron estimuladas con un grupo de péptidos Ova). Más aún, en este último punto de tiempo, se puede detectar todavía una actividad citotóxica *in vivo* 4 horas (no se muestran datos), y 24 horas (Figura 9 - las inyecciones incluyeron 0.2  $\mu$ g de STxB-OVA, 0.5  $\mu$ g de 3D-MPL y QS21 , y 5 $\mu$ g de CPG para AS H. Los métodos fueron llevados a cabo tal como se describen en 2.1.3 anteriormente) después de la inyección objetivo. Se investigó la respuesta humoral 15 días y 40 días después del refuerzo (Figura 10a - las inyecciones incluyeron 0.2  $\mu$ g de STxB-OVA, 0.5  $\mu$ g de 3D-MPL y QS21, y 5 $\mu$ g CPG para AS H. Los métodos fueron llevados a cabo tal como se describen en 2.1.4 anteriormente, los resultados se muestran a través del cálculo de la media geométrica para cada grupo de 10 ratones). En la ausencia de adyuvante, la STxB-ova sola no es capaz de inducir ninguna respuesta de las células B. En contraste, los títulos de anticuerpo equivalentes se detectan si la

proteína con adyuvante está acoplada a STxB o no en ambos puntos de tiempo de la prueba.

En la figura 10B (las inyecciones incluyeron 0.2  $\mu$ g de STxB-OVA, 0.5  $\mu$ g de 3D-MPL y QS21 , y 5 $\mu$ g CPG. los métodos fueron  
5 llevados a cabo tal como se describe en 2.1.5 anteriormente) se muestra la frecuencia de recuerdo anti-ova de las células B 78 días después de la inyección. Si bien los títulos del anticuerpo detectados 15 días y 40 días después de dos inyecciones son equivalentes, la calidad de la respuesta de recuerdo de la célula B  
10 es diferente, dado que una frecuencia mayor de recuerdo de las células B es detectada cuando se coloca adyuvante a STxB-ova comparado con la proteína auxiliada. La STxB-ova sola se incapaz de inducir recuerdo de la célula B por sí sola.

De manera interesante, cuando se proporciona sensibilización  
15 y el refuerzo a los 42 días en lugar de a los 14 días (Figura 20 - la inyección incluyó 0.5  $\mu$ g de STXB-OVA y 0.5  $\mu$ g de 3D-MPL y QS21, los métodos fueron llevados a cabo como en 2.1.4 anteriormente), la respuesta humoral inducida por STxB- OVA AS A es mayor que la de OVA AS A, lo que sugiere nuevamente que cuando se combina  
20 con la adición de adyuvante, la vectorización puede inducir una frecuencia más alta de células de recuerdo de células B.

### **3.1.3 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por dosis bajas de STxB-OVA combinada con el sistema adyuvante As H**

La Figura 13 (las inyecciones incluyeron 0.008, 0.04, 0.2 o 1  
25  $\mu$ g de STxB-OVA, 0.5  $\mu$ g de 3D- MPL y QS21, y 5 $\mu$ g CPG. Los

112

métodos fueron llevados a cabo tal como se describe en 2.1.1 anteriormente, se extrajo sangre a los ratones 14 días después de la primera inyección) muestra que todavía se puede detectar una población de CD8 específica para sllnfekl 14 días después de una sola inyección de dosis tan bajas como de 8 ng de STxB- ova, correspondientes a 4 ng de antígeno, formuladas en AS H. Estos resultados muestran que el uso combinado de adyuvante y sistema STxB podría permitir una reducción significativa de dosis de antígeno sin disminuir la respuesta inducida de las células T.

10 **3.2 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por STxB-OVA combinada con otros sistemas adyuvantes.**

Después esperamos descubrir si otros sistemas adyuvantes distintos de AS A o AS H también podrían sinergizar con el sistema de vectorización STxB.

15 **3.2.1 Evaluación de la respuesta inmunitaria después de la vacunación con vacunas AS A, F, D S o E STxB.**

La evaluación de la respuesta primaria indica claramente que una STxB-ova con adyuvante induce una alta frecuencia de TCD8 específicas para el antígeno (Figura 11 - los métodos fueron llevados a cabo tal como se describe en 2.1.1 anteriormente, se le extrajo sangre a los ratones 13 días después de la primera inyección), cualquiera que sea el sistema adyuvante sometido a prueba. Notablemente, esto puede verse aún con AS D y AS E para los cuales usualmente no se puede detectar respuesta de CD8 después de una sola inmunización con proteína auxiliada. La STxB-

20

25

114

ova sensibiliza fuertemente a las células T CD8 auxiliadas, las cuales se diferencian fácilmente en células T efectoras secretoras de citocina (no se muestran datos).

**3.2.2 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por STxB-OVA combinada con componentes individuales de sistemas adyuvantes (3 D-MPL - AS C2, QS21 - AS B, CpG2006 - AS G)**

A continuación evaluamos el componente diferente de los sistemas adyuvantes previos *in vivo*. La Figura 12A (los métodos fueron llevados a cabo tal como se describen en 2.1.1 anteriormente, se le extrajo sangre a los ratones 15 días después de la primera inyección) muestra que la población de CD8 específica para sifneki se puede detectar si STxB-ova está auxiliada con un solo estimulante, tal como QS21 o un ligando TLR9 tal como CpG y en una extensión menor con un ligando TLR-4 tal como 3 D-MPL (AS C2), este último Inmunoestimulante es aún más eficiente cuando se usa en una dosis más alta (AS C1) como en la figura 16. Como antes, estas células T CD8 son células efectoras secretoras de citocina fácilmente diferenciadas (no se muestran datos). Las respuestas de CD8 inducidas por cada componente del adyuvante solo, son equivalentes, pero se observan respuestas más altas cuando la STxB-ova es auxiliada con una combinación de QS21 y al menos un ligando TLR (Figura 12B - los métodos fueron llevados a cabo tal como se describen en 2.1.1 anteriormente, se extrajo sangre a los ratones a los 6 días después de la segunda inyección).

### **3.2.3 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por STxB-OVA combinada con Adyuvante J o Adyuvante K**

En contraste con las observaciones publicadas previamente, el aumento de la respuesta de CD8 se observa también cuando STxB-OVA se combina con una emulsión tal como IFA. La formulación con IFA, una emulsión de agua en aceite, aumenta las respuestas de CD8 de una forma dependiente de la dosis. La frecuencia aumentada de células T CD8 específicas para sifnekl (Figura 14A) corresponde a funciones efectoras de CD8, tales como producción de citocina (Figura 14B) y actividad citotóxica (Figura 14C). Se obtienen resultados similares cuando STxB-ova se combina con una emulsión de aceite en agua.

### **3.2.4 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por STxB ova combinada con sistema adyuvante C1, B, K, F o T**

A continuación, evaluamos AS T y los diferentes componentes del sistema adyuvante F. La figura 16 muestra que cuando se combina con STxB-OVA, cada componente es capaz de aumentar la respuesta de T CD8 específica para sifnekl. Sin embargo, la respuesta más alta se observa cuando los componentes se asocian en la formulación.

### **3.2.5 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por STxB ova combinada con adyuvante L, G o M.**

La figura 15 muestra que la combinación de STX-B-OVA con ligandos TLR tales como secuencias poli I:C (TLR3) o CpG (TLR9) representativas de las categorías B y C aumenta significativamente

la respuesta inmunológica de T CD8 específica para siinfekl.

### **3.2.6 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por STxB ova combinada con el sistema adyuvante B, N o I**

La figura 17 muestra que la respuesta de CD8 inducida por STxB-OVA es mejorada claramente cuando se auxilia ya sea con QS21 solo o con QS21 combinado con un ligando TLR3 (poli I:C) o con un ligando TLR9 (CpG).

### **3.2.7 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por STxB ova combinada con sistema adyuvante G, O, P o Q**

Figura 18 muestra que la respuesta de CD8 inducida por STxB-OVA se mejora claramente cuando se auxilia ya sea con CpG sola o con CpG combinada con IFA o con diferentes emulsiones de aceite en agua.

### **3.2.8 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por STxB ova combinada con sistema adyuvante G, R o S**

La Figura 19 muestra que la respuesta de CD8 inducida por STX-B-OVA es mejorada claramente cuando se auxilia con CpG sola o con CpG combinada con Al(OH)<sub>3</sub> o AlPO<sub>4</sub>.

### **3.2.9 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por STxB ova combinada con sistema adyuvante G, L, U o V**

La Figura 21 muestra que, además de los ligandos TLR9 y 3, la combinación de STX-B-OVA con los ligandos TLR2 y TLR7/8 también aumenta significativamente la amplitud de la respuesta T CD8 específica para siinfekl. Se sometió a prueba el ligando TLR2 en una gama de dosis desde 0.2 hasta 10 µg. No se observó 5 µg.

De manera interesante, se observó una respuesta reducida cuando se aumentó la dosis a 10  $\mu$ g. Esto se podría explicar por la capacidad del ligando TLR2 de inducir las moléculas reguladoras tales como IL-10.

**5    3.2.10 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por STxB ova combinada con sistema adyuvante W1 o W2.**

La Figura 22 muestra que la combinación de STxB-Ova con AS W1 (que contiene fosfato de aluminio en una formulación en la cual el antígeno es adsorbido en la sal de aluminio) proporciona poca mejora en la respuesta inmunitaria sobre la observada con el péptido STxB-ova con adyuvante. Sin embargo, (en este caso aproximadamente 70%) no se adsorbe en la sal de aluminio, por ejemplo realizando la adsorción con sal de aluminio disuelta en salina regulada fosfatada tal como se observa en AS W2, luego se observa una respuesta inmunitaria sobre la dada por STxB-Ova sin adyuvante.

10

15

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para vacuna que contiene la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente inmunológicamente funcional de ella que es capaz de fijar el receptor Gb3, en formación de complejo con un antígeno, y además contiene un adyuvante, siempre que cuando el adyuvante sea solamente una sal metálica, esté formulado de tal manera que no más de aproximadamente 50% del antígeno sea adsorbido en la sal metálica, caracterizado porque el adyuvante se selecciona del grupo de sales metálicas, emulsiones de aceite en agua, agonistas del receptor tipo toll, QS21 o combinaciones de ellos.
2. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada además porque el equivalente inmunológicamente funcional de la subunidad B de la toxina Shiga tiene al menos 50% de identidad de secuencia de aminoácidos con la subunidad B de la toxina Shiga.
3. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada además porque el vector es la subunidad B de la toxina Shiga o un fragmento funcional de ella.
4. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada además porque el vector es la subunidad B de la Verotoxina 1 o un fragmento funcional de ella.
5. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada además porque el adyuvante es un

agonista del receptor de tipo toll.

6. Una composición para vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada además porque el antígeno y la subunidad B están unidos  
5 covalentemente.

7. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada además porque el antígeno está unido a la toxina por medio de un residuo de cisteína.

8. Una composición para vacuna de acuerdo con  
10 cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada además porque el adyuvante se selecciona del grupo: sales metálicas, QS21, lípido A o derivado de él, un fosfato de alquil glucosaminida, un oligonucleótido inmunoestimulador o combinaciones de ellos.

15 9. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada además porque la QS21 es presentada en la forma de un liposoma, Iscom, o una emulsión de aceite en agua.

10 10. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 5 y con la reivindicación 8, caracterizada porque el derivado de lípido A se selecciona de lípido A monofosforil, lípido A monofosforil 3 desacilado, OM 174, OM 197, OM 294.

25 11. Una composición para vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 10, caracterizada además porque el adyuvante es una combinación de al menos un

representante de dos de los siguientes grupos:

- i) QS21,
- ii) un agonista del receptor 4 de tipo toll, y
- iii) un agonista del receptor 9 de tipo toll.

- 5           12. Una composición para vacuna de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizada además porque la saponina es QS21 y el agonista del receptor 4 de tipo peaje es lípido A monofosforil 3 desacilado, y el receptor 9 de tipo peaje es un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG.
- 10           13. Una composición para vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 12, caracterizada además porque el antígeno se selecciona del grupo de antígenos que proporciona inmunidad contra el grupo de enfermedades seleccionadas de patógenos intracelulares o enfermedades
- 15           proliferativas.
14. Una composición para vacuna que contiene la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente inmunológicamente funcional de ella, con un antígeno y un adyuvante para su uso en medicina.
15. Un proceso para la producción de una vacuna de
- 20           acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 13, caracterizado además porque un antígeno en combinación con la subunidad B de la toxina Shiga o con el equivalente inmunológicamente funcional de ella, está mezclado con un adyuvante, caracterizado además porque el adyuvante se
- 25           selecciona del grupo de sales metálicas, emulsiones de aceite en

**agua, agonistas del receptor de tipo toll, QS21 o combinaciones de ellos.**

121

FIG. 1

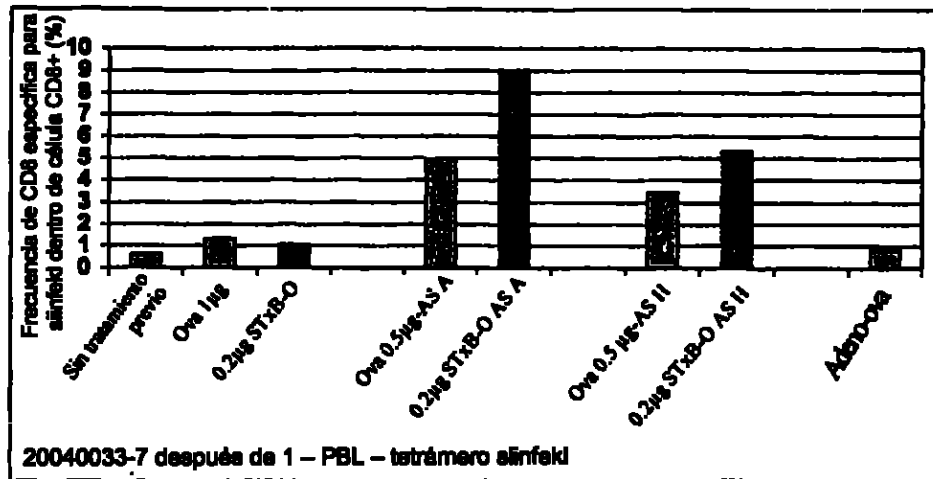
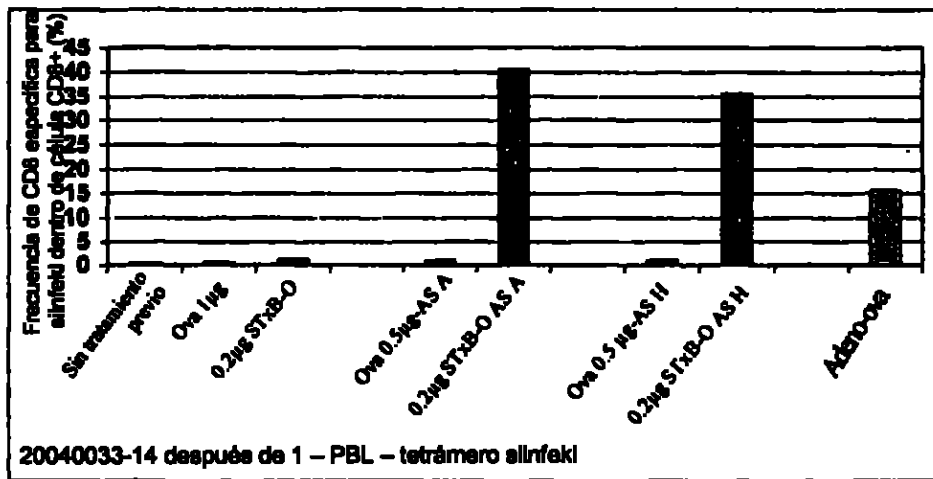


FIG. 2



123

FIG. 3

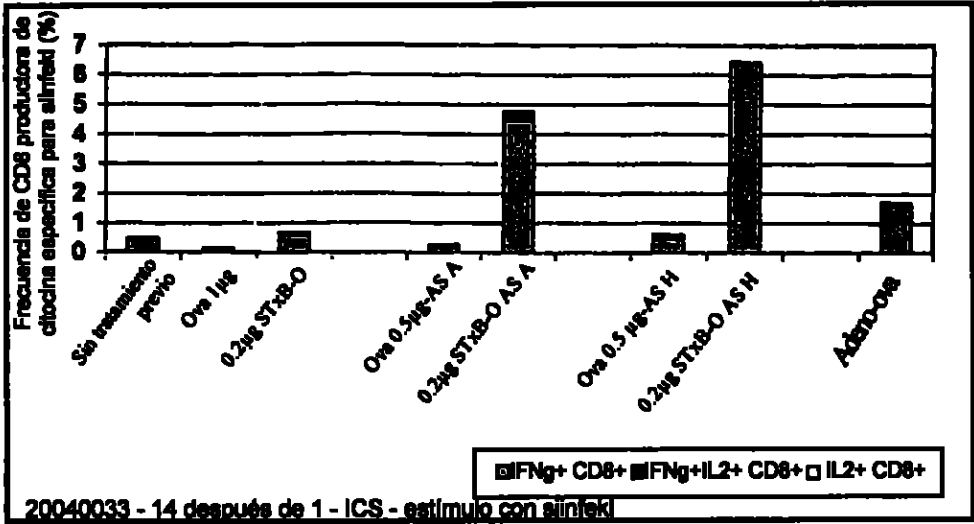


FIG. 4

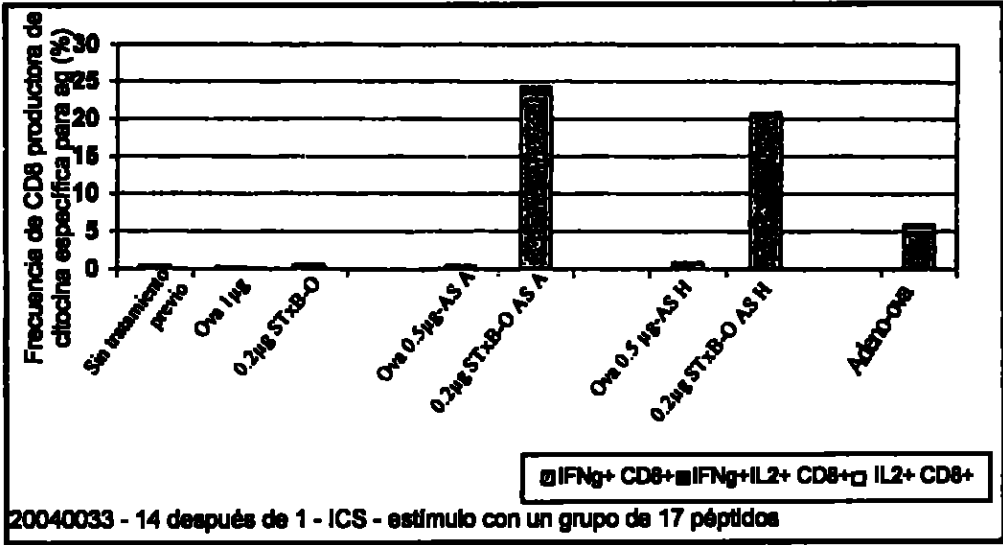


FIG. 5

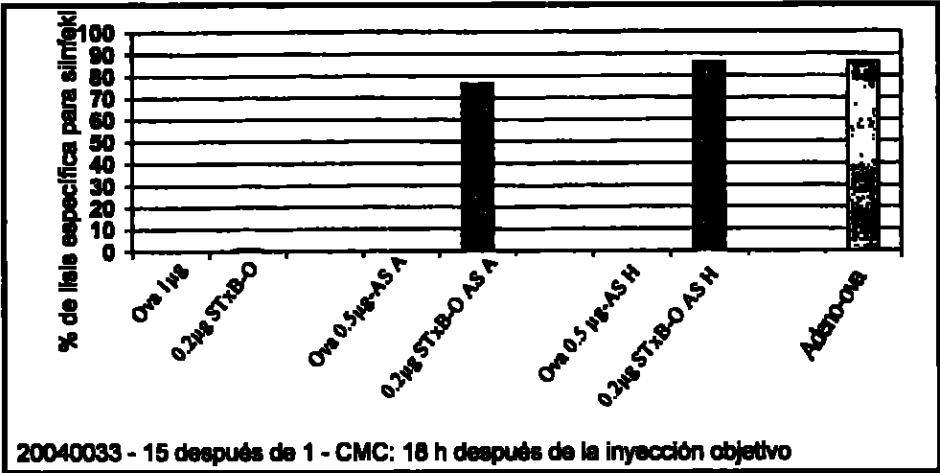


FIG. 6A

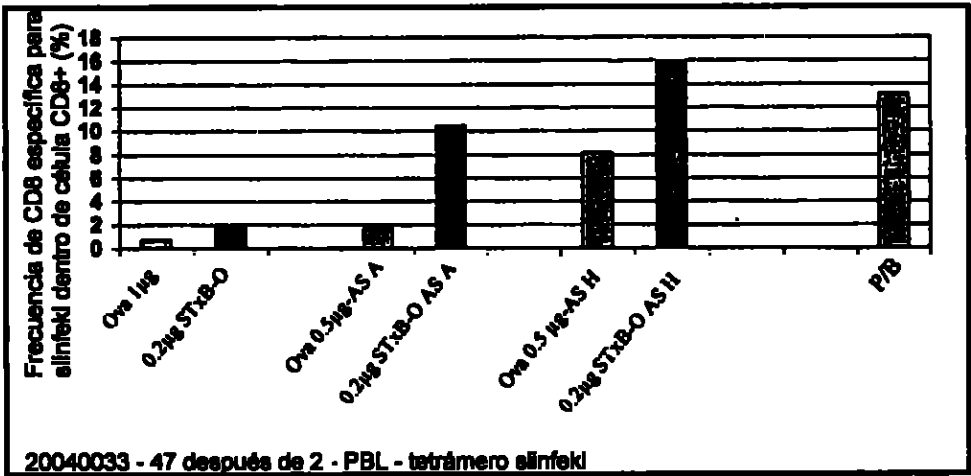


FIG. 6B

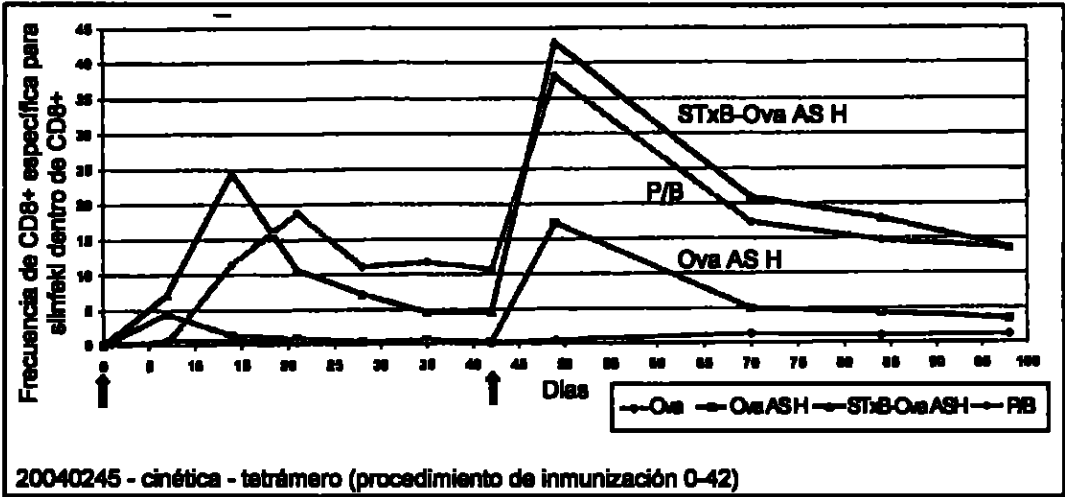


FIG. 7

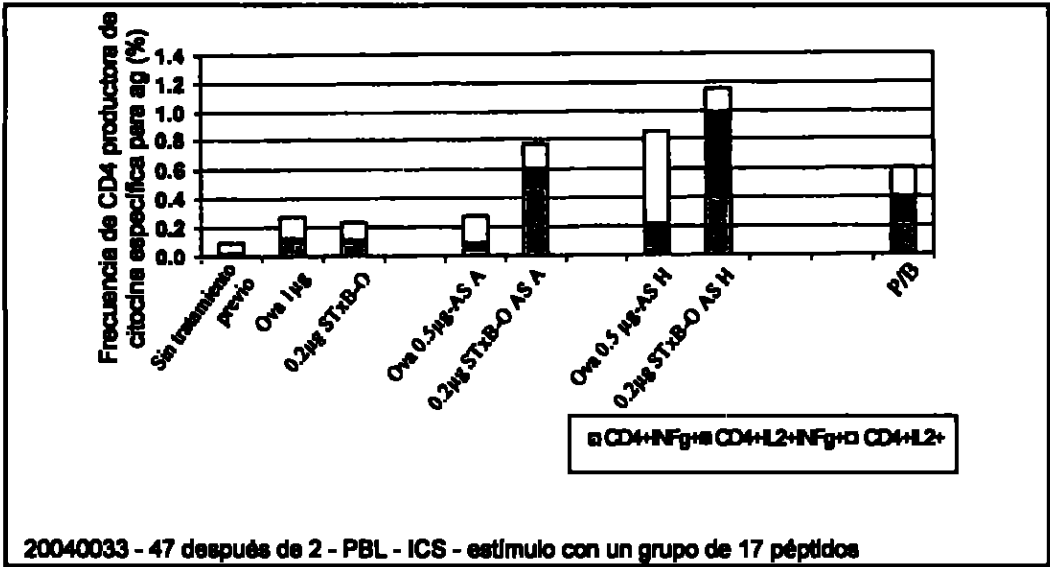


FIG. 8

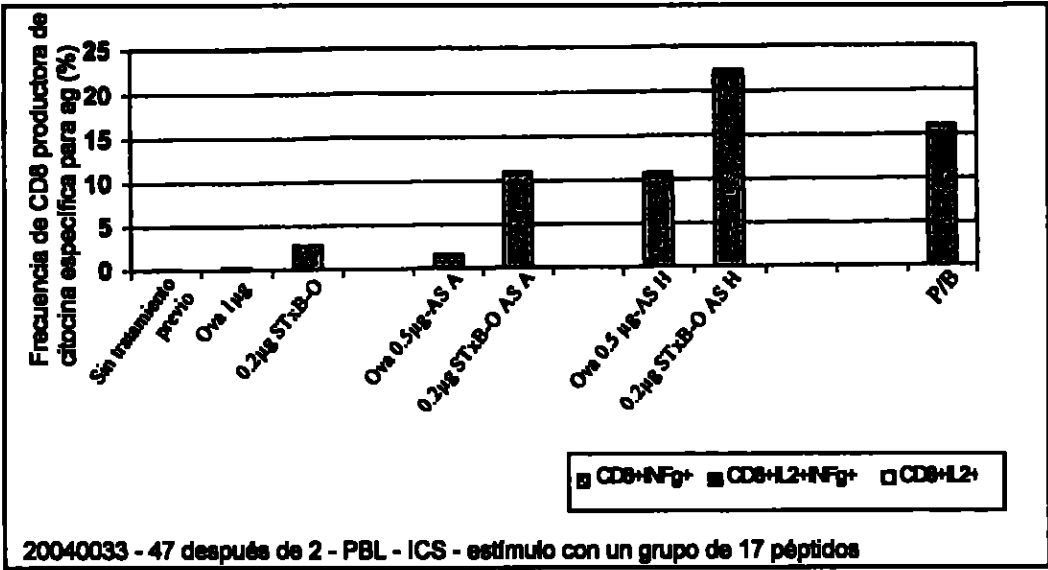


FIG. 9

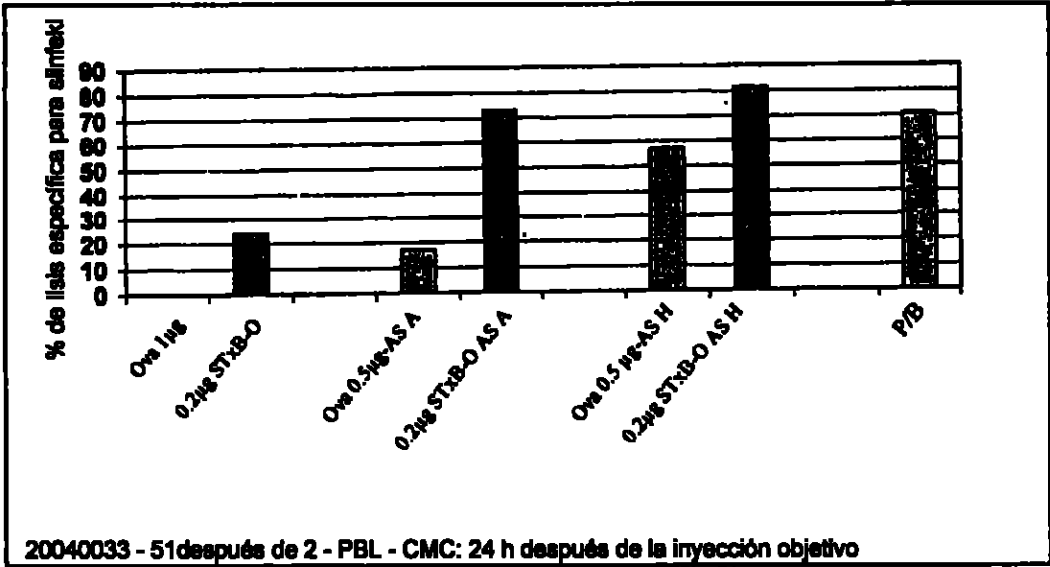


FIG. 10A

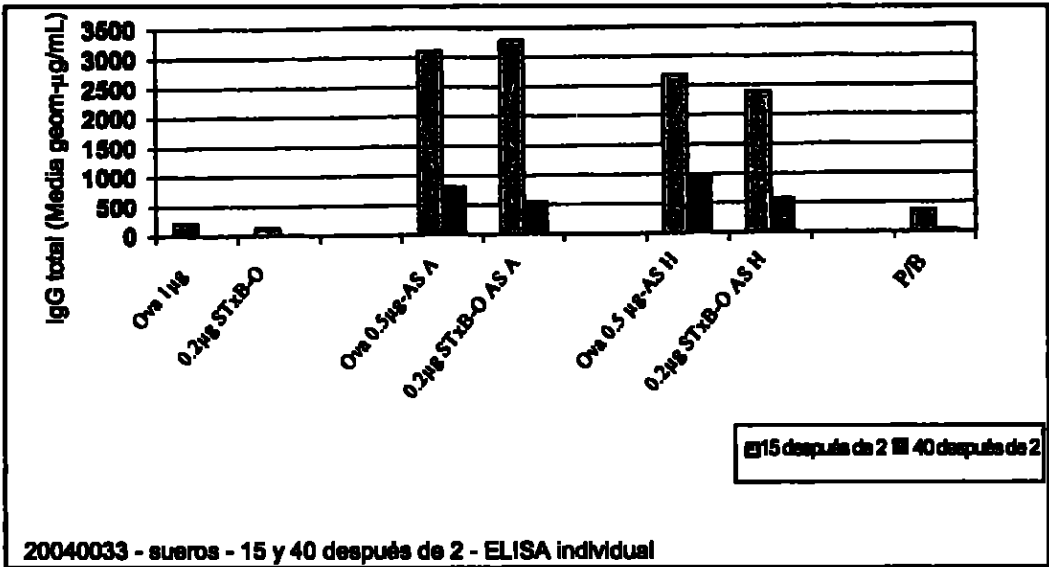


FIG. 10B

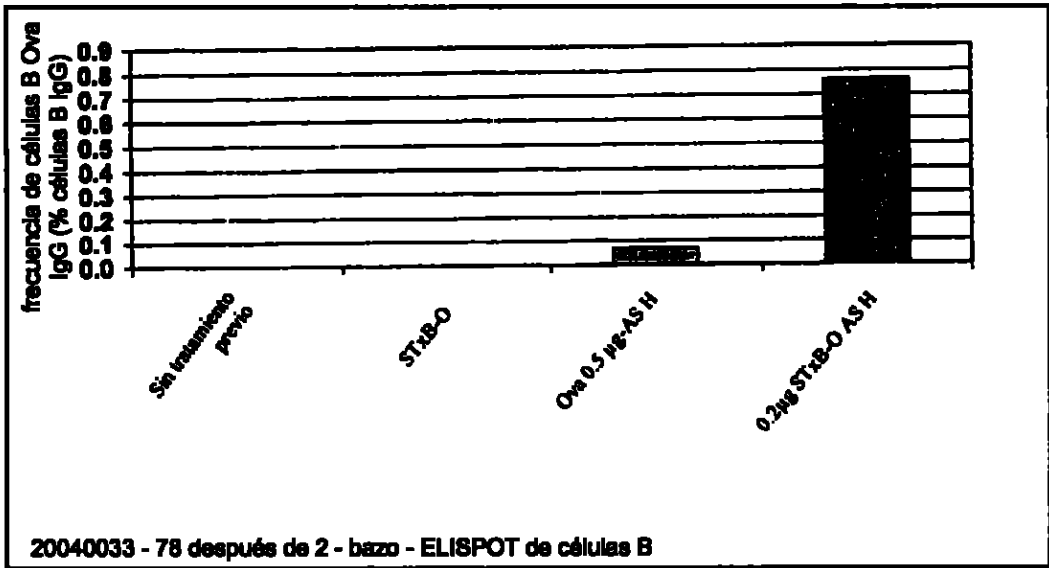


FIG. 11

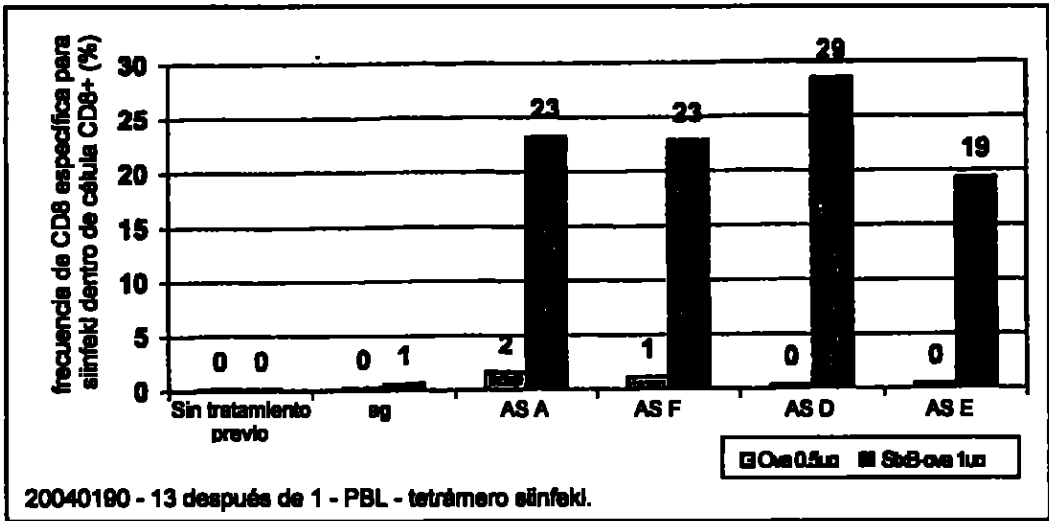


FIG. 12A

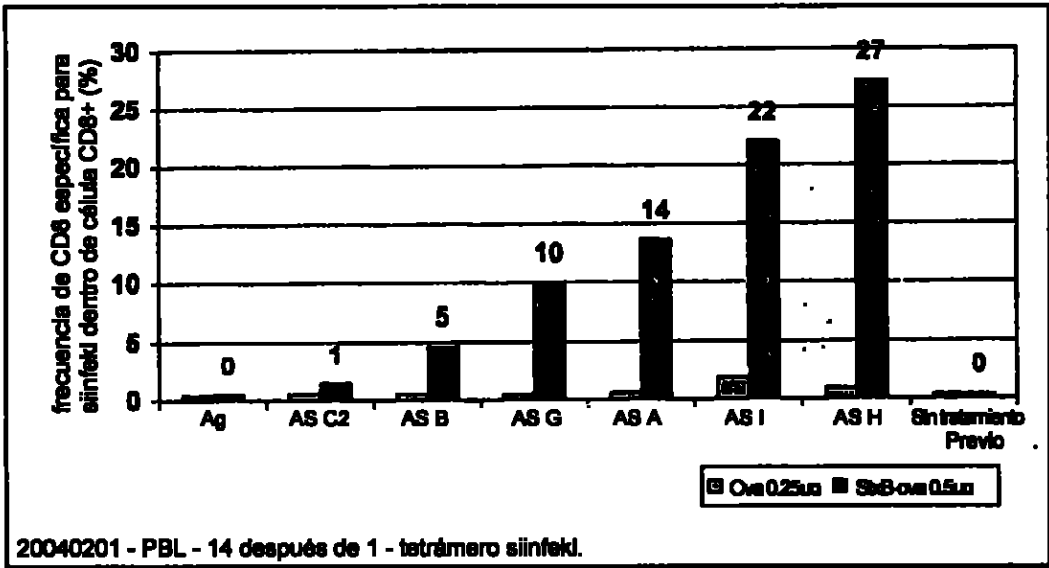


FIG. 12B

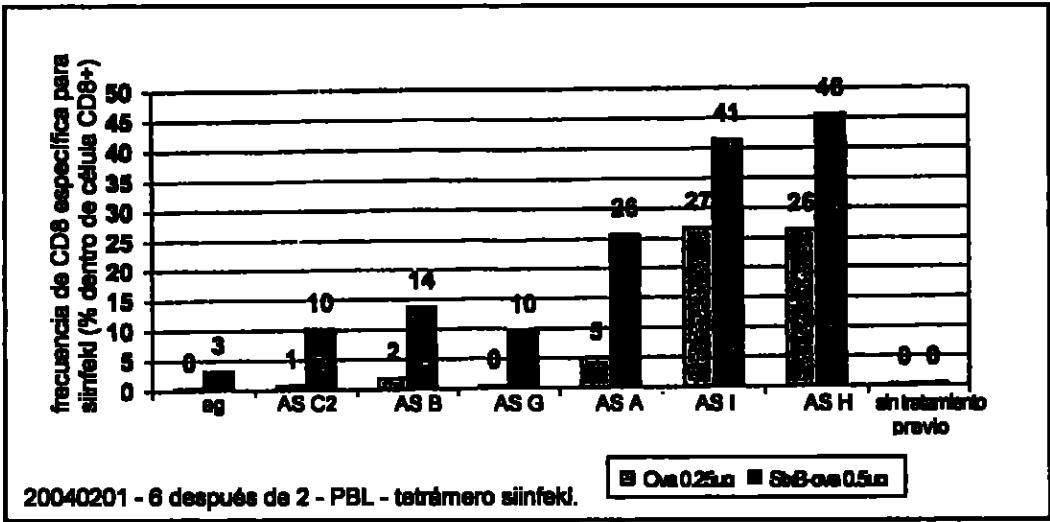
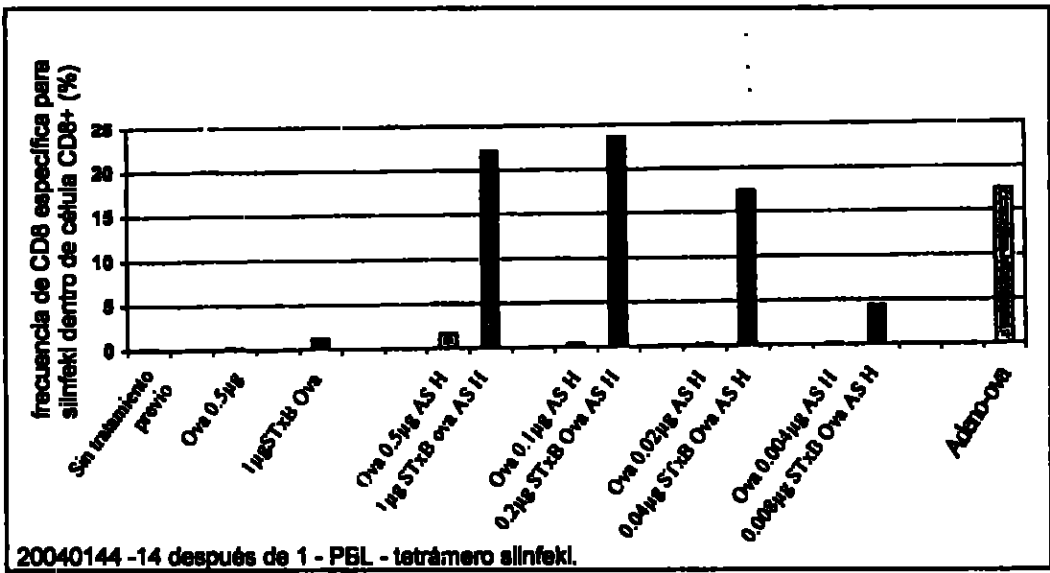


FIG. 13



129

9/13

FIG. 14A

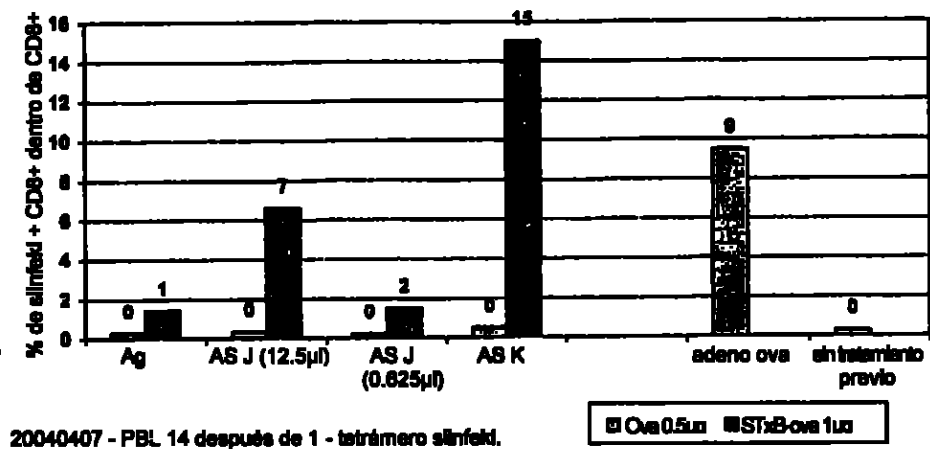


FIG. 14B

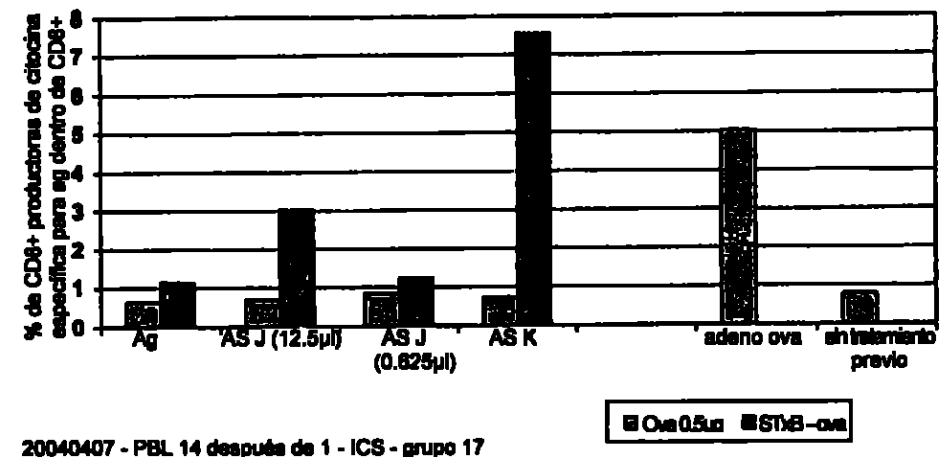
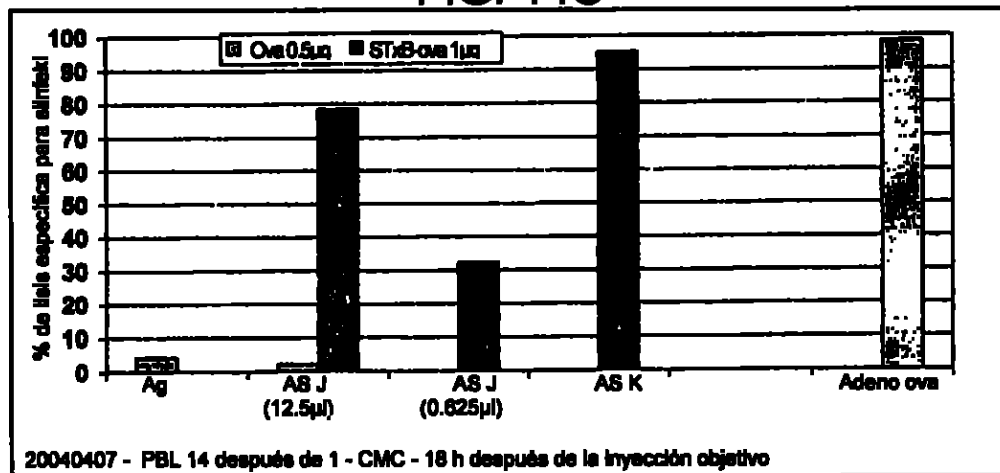


FIG. 14C



131

10/13

FIG. 15

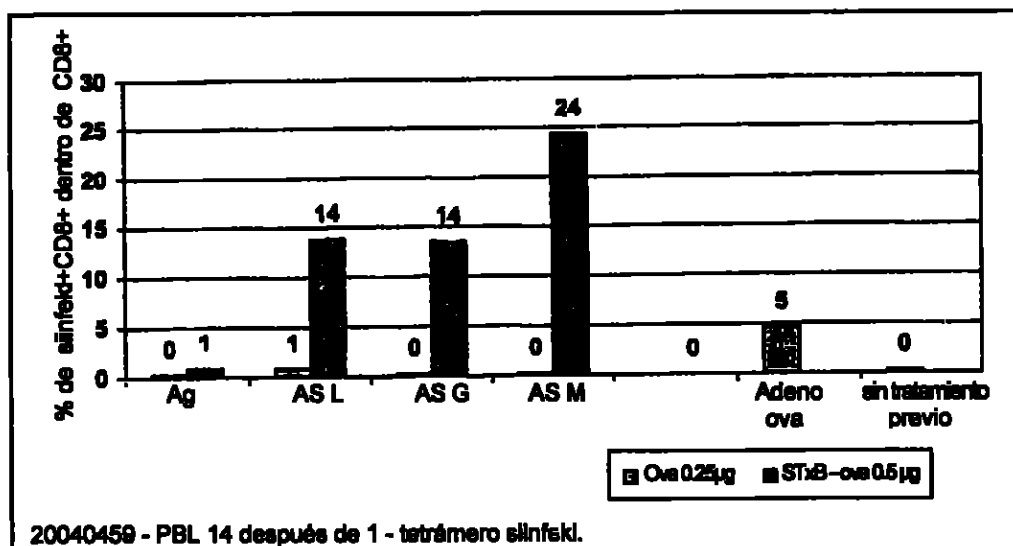


FIG. 16

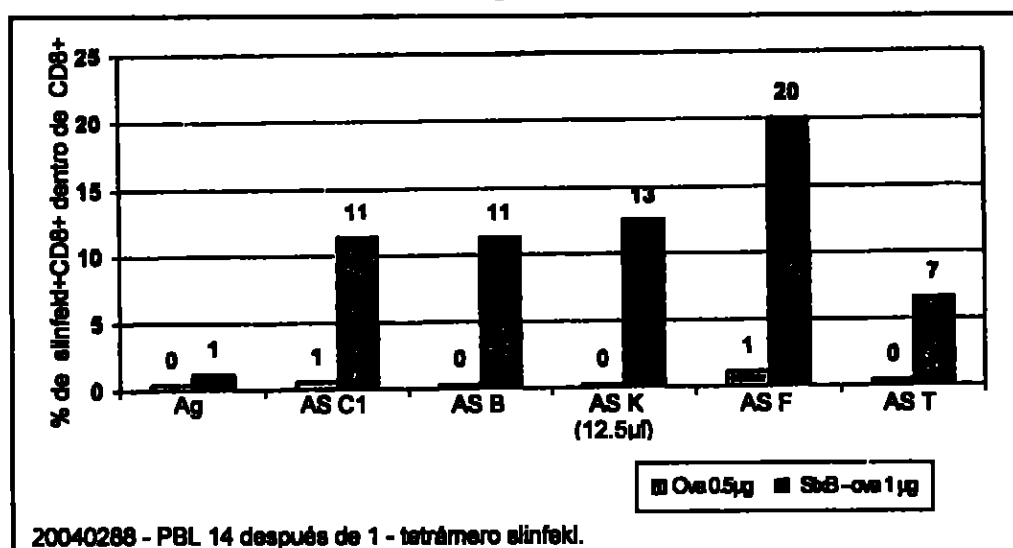


FIG. 17

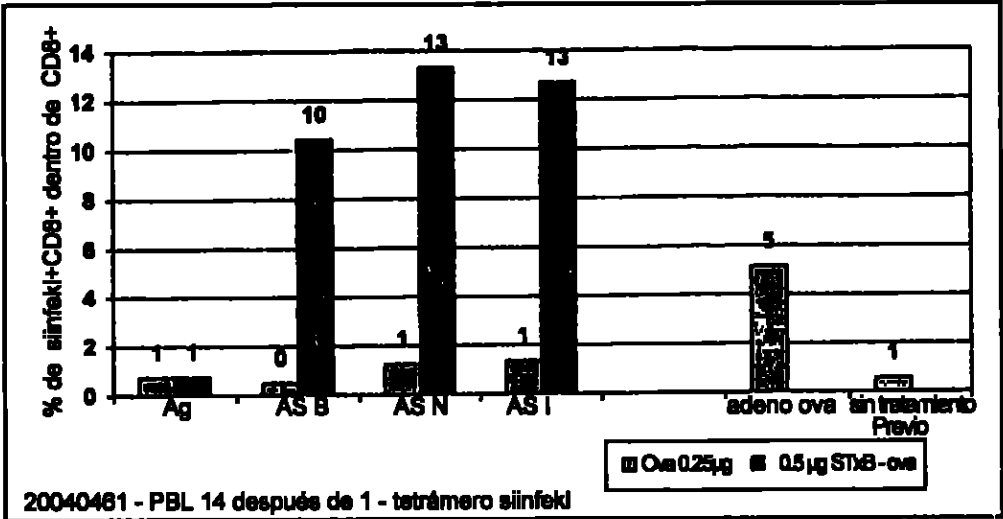


FIG. 18

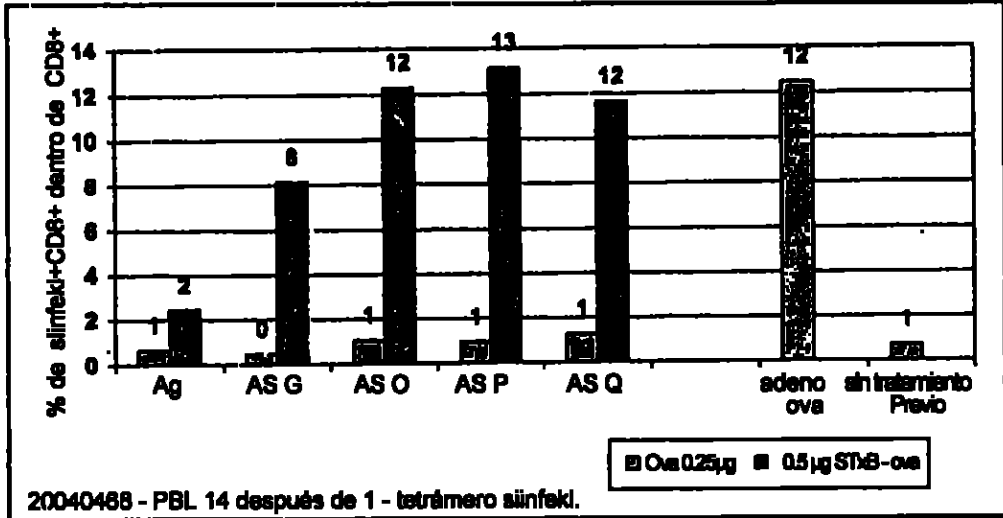


FIG. 19

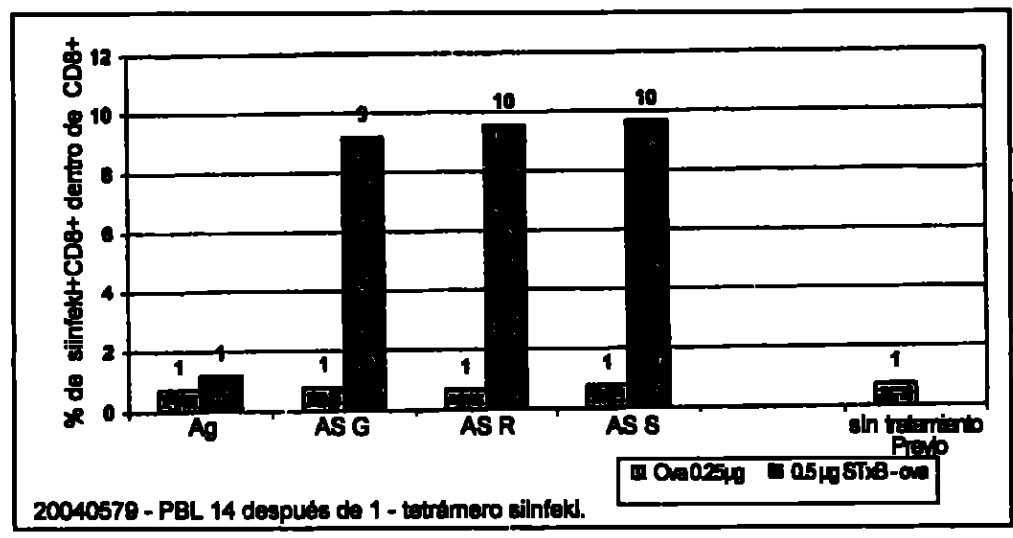


FIG. 20

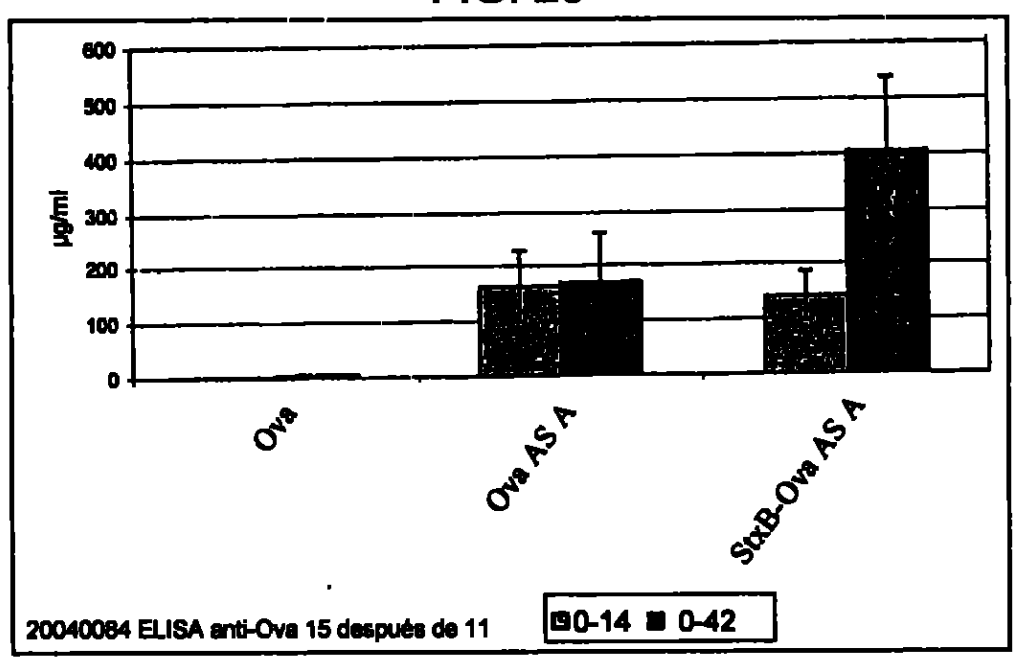


FIG. 21

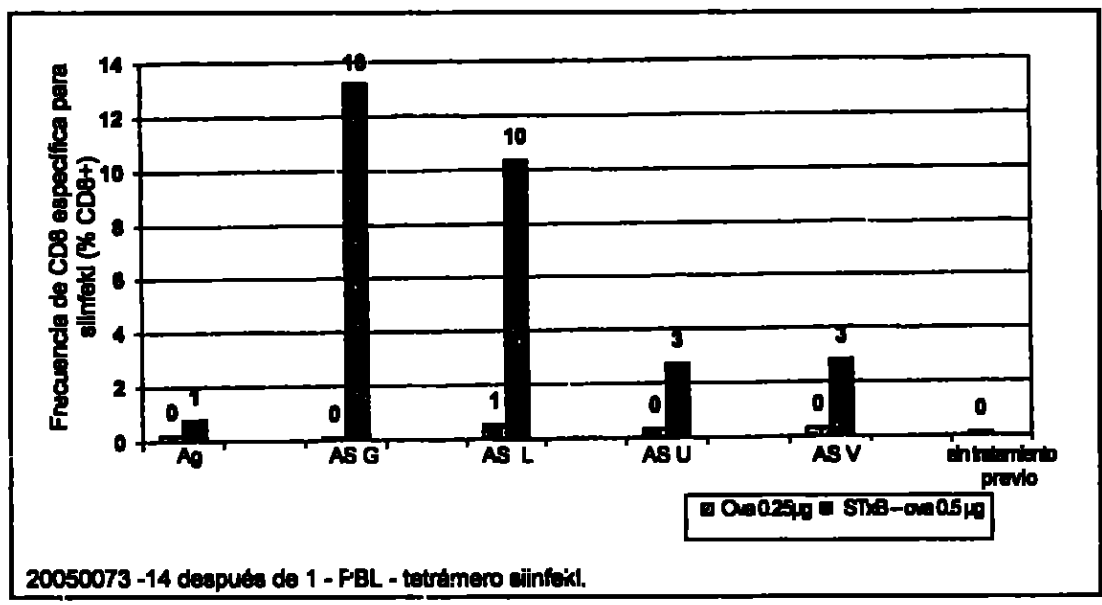
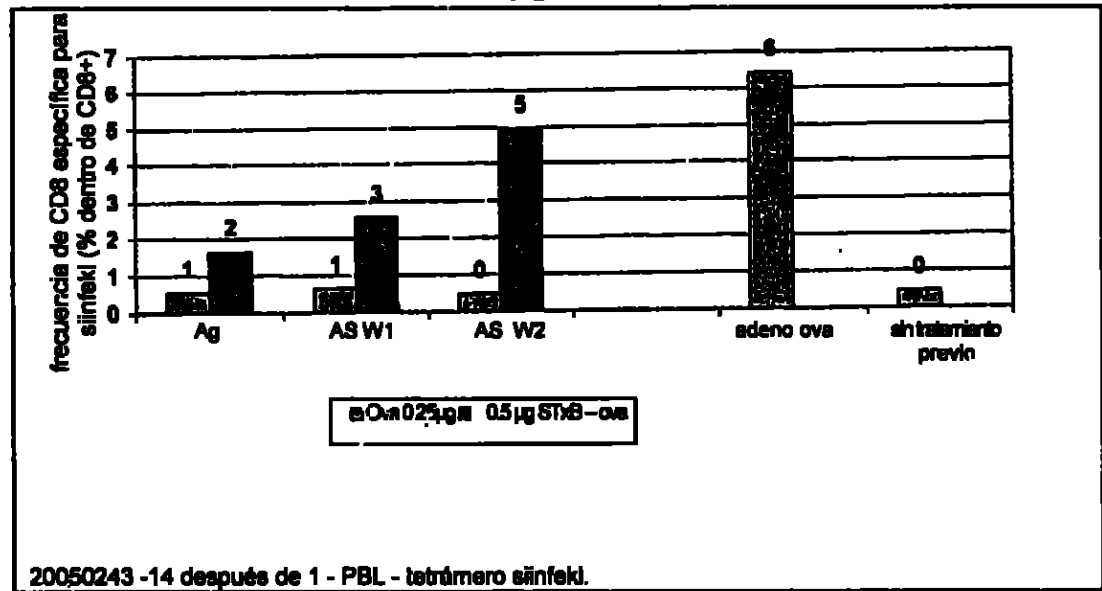


FIG. 22



**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE  
PCT**

**PATENTE DE INVENCION** [ x ]

**MODELO DE UTILIDAD** [ ]

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 53
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 123
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

**COMPLETA** [x]

**INCOMPLETA** [ ]

**DISEÑO INDUSTRIAL** [ ]

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

**COMPLETA** [ ]

**INCOMPLETA** [ ]

**ESQUEMA DE TRAZADO** [ ]

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

**COMPLETA** [ ]

**INCOMPLETA** [ ]

  
Firma/Responsable

Fecha 21 de Nov 2006

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10  
Conmutador: 3 82 08 40  
Fax: 350 52 20  
E-mail: [info@slc.gov.co](mailto:info@slc.gov.co)  
[www.slc.gov.co](http://www.slc.gov.co)  
Bogotá, D.C., Colombia

137  
135

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Bogotá,  
2020

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

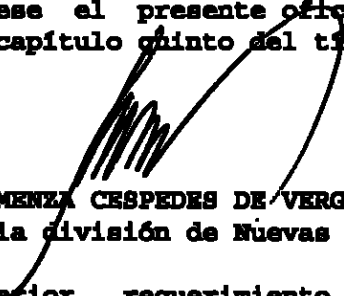
|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 6 117698          |
|            | Solicitud internacional    | PCT/EP2005/005555 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 21/12/2006        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | 14886             |

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

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 enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

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

  
ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 29 DIC. 2006 salvado.