



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Organizacion CSA Ltda

NOV 21

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-123217

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO "COMPOSICION DE VACUNA QUE COMPRENDE SUBUNIDAD B DE TERMO TOXINA E. COLI
Y UN ANTIGENO Y UN ADYUVANTE"



51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/02

71. SOLICITANTE GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

DOMICILIO RIXENSART, BELGICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLORED A RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 21 NOV 2007

202099

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-123217- -00000-0000

Fecha: 2007-11-21 16:47:21 Dep. 2020 NUECREACIÓN
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 151

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

14 dic 2007

1 SOLICITUD DE: ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. Dirección: Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica. Nacionalidad o Domicilio: Rixensart, Bélgica. Lugar de Constitución: Bélgica. Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
	Nombre: ALICIA LLORED RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com		C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>39.690.713</u> TP <u>53.215</u>
4 INVENTOR(ES) (72)	Nombre: DEWERCHIN, Marianne. Dirección: GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue De l'Institut 89, B-1330 Rixensart. Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/GB2006/001832</u> Fecha: <u>18/05/06</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2006/123155 A3</u> Fecha: <u>23/11/06</u>			
6 Título (54) "COMPOSICIÓN DE VACUNA QUE COMPRENDE SUBUNIDAD B DE TERMO TOXINA E. COLI Y UN ANTÍGENO Y UN ADYUVANTE"			
7 Clasificación Internacional (51) <u>A61K 39/02</u>			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	GB	19/05/05	0510280.1
	GB	30/11/05	0524407.4
9 Comprobante de Pago No. <u>07-92,287</u> Fecha: <u>14 de Noviembre de 2007</u>			

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita 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, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 92,287
FECHA : NOVIEMBRE 14 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-123217- -00000-0000

Fecha: 2007-11-21 16:47:21 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 151

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDY Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	72074903	14/11/2007	12,224,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

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

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



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260567
Anita Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

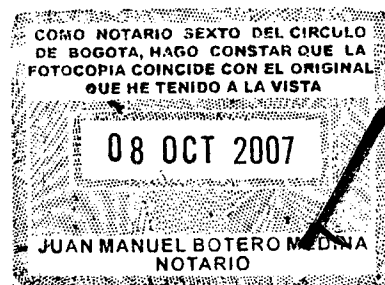
W. Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es 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



Yo, 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-1330 Rixensart, Bélgica;

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

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

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

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



SCRIPPER
NOTARIES

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
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

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

9. Stamp:
timbre:



10. Signature: W GLASS

W GLASS

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

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

08 OCT 2007

JUAN MANUEL BOTERO MELNA
NOTARIO

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 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

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

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

Dado y firmado

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

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

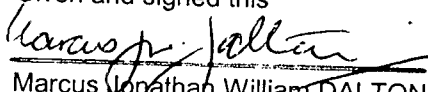
hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial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

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

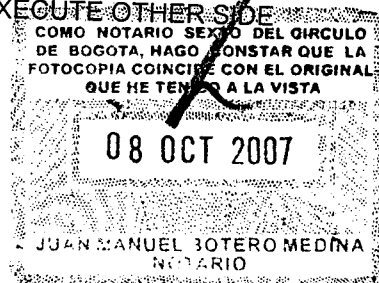
We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

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

que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad. El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en con fecha y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

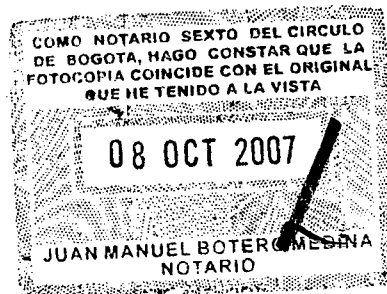
On this day of , 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

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

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

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

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



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 39/02	
(22) Fecha de solicitud: 21-11-07		(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0510280.1	19-05-05	GB
	0524407.4	30-11-05	GB
		(72) Inventor(es): DEWERCHIN, Marianne.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 19-12-07		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 23-11-06	
Fecha de presentación de la solicitud: 18-05-06		N° publicación: WO 2006/123155 A3	
No. de solicitud: PCT/GB2006/001832			
(54) Título: COMPOSICIÓN DE VACUNA QUE COMPRENDE SUBUNIDAD B DE TERMO TOXINA E. COLI Y UN ANTÍGENO Y UN ADYUVANTE			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Una composición de vacuna que comprende la subunidad B de toxina termo-lábil de *E. coli* o de un derivado de la misma con homología igual o mayor de 90% complejada con un antígeno y un adyuvante.

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 SAC/VB61411	PARA FUTURAS ACCIONES	ver Forma PCT/ISA/220 así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.
Solicitud internacional No. PCT/GB2006/001832	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 18/05/2006	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 19/05/2005
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

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

Este reporte de búsqueda internacional consta de un total de 10 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 con base en:

☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó

☐ una traducción de la solicitud internacional en _____, la cual es el lenguaje de una traducción suministrada para los propósitos de búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b))

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

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

3. ☒ Falta unidad de invención (ver Casilla No. III)

4. Respecto al título,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

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

COMPOSICIÓN DE VACUNA QUE COMPRENDE SUBUNIDAD B DE TERMO TOXINA E. COLI Y UN ANTÍGENO Y UN ADYUVANTE

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.

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

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótido y/o aminoácido revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, la búsqueda internacional fue llevada a cabo sobre las bases de:
 - a. tipo de material
 - ☒ un listado de secuencia
 - ☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencia
 - b. formato de material
 - ☒ en formato escrito
 - ☒ en formato electrónico
 - c. tiempo de presentación/suministro
 - ☐ contenido en la solicitud internacional como fue presentada
 - ☐ presentado junto con la solicitud internacional en formato electrónico
 - ☒ suministrado subsecuentemente a esta Autoridad para el propósito de la búsqueda
2. ☐ Además, en el caso que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o además una tabla relacionada ha sido presentada o suministrada, las declaraciones requeridas que la información en las copias subsecuentes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud como fue presentada, o no va más allá de la solicitud como fue presentada, como en forma apropiada, fueron suministradas.
3. Comentarios adicionales:

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:

- ☐ Reivindicaciones Nos.:
 porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:
- ☐ 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:
- ☐ 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:

ver hoja adicional

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

CONTINUACIÓN DE INFORMACIÓN ADICIONAL PCT/ISA/210

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, como sigue:

1. Reivindicación: 1 a 14 y 16 a 20 (completas) y 15 (parcialmente):

Una composición de vacuna que comprende la subunidad-B de toxina lábil al calor de E. Coli o un derivado de la misma con homología igual o mayor que 90% acomplejada con un antígeno y un adyuvante, uso de dicha composición para la manufactura de una vacuna y proceso de producción de dicha vacuna.

2. Reivindicación: 15 (parcialmente):

Una composición de vacuna que comprende un vector no-vivo derivado de una toxina bacteriana con un antígeno y un adyuvante en la medida en que esto no comprende la subunidad-B de toxina lábil al calor de E. Coli o un derivado de la misma.

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/GB2006/001832

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO INV. A61K39/02		
Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC		
B. CAMPOS BUSCADOS		
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación) 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, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	MCCLUSKIE M J Y COL: "Inmunización vía mucosa de ratones usando ADN CpG y/o mutantes de la enterotoxina lábil al calor de Escherichia coli como adyuvantes" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 27, 14 de Junio de 2001 (2001-06-14), páginas 3759-3768, XP004241795 ISSN: 0264-410X citado en la solicitud el documento completo	1, 2, 6, 8, 14-16, 20
☒ En el recuadro C se enumeran más documentos. ☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes. ° Categorías especiales de documentos citados: 'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular 'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional 'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada 'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica '&' documento miembro de la misma familia de patentes Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 27 de Abril de 2007 Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 23/05/2007 Nombre y dirección de correo de la ISA/ Oficina de Patentes Europea, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 Funcionario autorizado Hix, Rebecca		

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/GB2006/001832

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	MCCLUSKIE M J Y COL: "Inmunización intranasal de ratones con ADN CpG que induce una fuerte respuesta sistémica y vía mucosa la cual está influenciada por otros adyuvantes para vía mucosa y distribución de antígenos" MOLECULAR MEDICINE (CAMBRIDGE, MASS.) OCTUBRE DE 2000, vol. 6, no. 10, Octubre de 2000 (2000-10), páginas 867-877, XP002415521 ISSN: 1076-1551 citado en la solicitud el documento completo	1, 2, 6, 8, 14-16, 20
X	----- TAMURA Y COL: "Subunidades B de enterotoxinas lábiles al calor de Escherichia coli suplementadas con una cantidad traza de la holotoxina como un adyuvante para vacuna de influenza nasal" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 12, no. 12, 1994, páginas 1083-1089, XP002100633 ISSN: 0264-410X el documento completo	1, 2, 15, 16, 20
X	----- TAMURA S Y COL: "Acción sinérgica de la subunidad B de toxina de cólera (y subunidad B de toxina lábil al calor de Escherichia coli) y una cantidad traza de toxina completa de cólera como un adyuvante para vacuna de influenza nasal" VACCINE APR 1994, vol. 12, no. 5, Abril de 1994 (1994-04), páginas 419-426, XP002415522 ISSN: 0264-410X el documento completo	1, 2, 15, 16, 20
Y	----- APOSTOLAKI MARIA Y COL: "La liberación nasal de antígeno con la subunidad B de enterotoxina lábil al calor de Escherichia coli aumenta la expansión y diferenciación clonal de células T específicas al antígeno" INFECTION AND IMMUNITY JULIO DE 2004, vol. 72, no. 7, Julio de 2004 (2004-07), páginas 4072-4080, XP002415523 ISSN: 0019-9567 el documento completo ----- -/--	1-20

17

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2006/001832

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	LYCKE NILS: "De toxina a adyuvante: el diseño racional de un vector de adyuvante de vacuna, CTA1-DD/ISCOM" CELLULAR MICROBIOLOGY ENERO DE 2004, vol. 6, no. 1, Enero de 2004 (2004-01), páginas 23-32, XP002431449 ISSN: 1462-5814 el documento completo	15
X	----- CHOI A H Y COL: "El nivel de protección contra el vertimiento de rotavirus en ratones seguido de la inmunización con una proteína quimérica VP6, es dependiente de la ruta y el adyuvante coadministrado" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 13-14, 15 de Marzo de 2002 (2002-03-15), páginas 1733-1740, XP004366009 ISSN: 0264-410X el documento completo	15
X	----- OLSZEWSKA W Y COL: "Respuestas de anticuerpos de antipéptidos siguiendo la inmunización intranasal: efectividad de adyuvantes para via mucosa" INFECTION AND IMMUNITY SEPTIEMBRE DE 2000, vol. 68, no. 9, Septiembre de 2000 (2000-09), páginas 4923-4929, XP002431450 ISSN: 0019-9567 el documento completo	15
X	----- VAJDY M Y COL: "Adyuvantes para via mucosa y sistemas de liberación para vacunas basadas en proteína, ADN y ARN" IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY, CARLTON, AU, vol. 82, no. 6, Diciembre de 2004 (2004-12), páginas 617-627, XP002370291 el documento completo	15
Y	----- FREIDAG B L Y COL: "Oligodeoxinucleótidos CpG e interleuquina-12 mejoran la eficacia de vacunación de Mycobacterium bovis BCG en ratones repugnados con M. Tuberculosis" INFECTION AND IMMUNITY MAYO DE 2000, vol. 68, no. 5, Mayo de 2000 (2000-05), páginas 2948-2953, XP002431451 ISSN: 0019-9567 el documento completo ----- -/--	15

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	ARRINGTON J Y COL: "Vectores de plásmido que codifican toxinas de cólera o la enterotoxina lábil al calor de Escherichia coli, son fuertes adyuvantes para vacunas de ADN" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 76, no. 9, Mayo de 2002 (2002-05), páginas 4536-4546, XP002379962 ISSN: 0022-538X el documento completo	15
Y	HOLMGREN JAN Y COL: "Inmunización de mucosa y adyuvantes: una breve revisión de recientes avances y desafíos" VACCINE 1 DE JUNIO DE 2003, vol. 21, Suppl 2, 1 de Junio de 2003 (2003-06-01), páginas S89-S95, XP002431452 ISSN: 0264-410X el documento completo	15
Y	LEE JOHN S Y COL: "Vectores virales para uso en el desarrollo de vacunas de biodefensa" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS 17 DE JUNIO DE 2005, vol. 57, no. 9, 15 de Abril de 2005 (2005-04-15), páginas 1293-1314, XP002431453 ISSN: 0169-409X el documento completo	15
Y	KRIEG A M Y COL: "VACUNAS MEJORADORAS CON ADN CPG INMUNO ESTIMULATORIO" CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, CURRENT DRUGS, LONDRES, GB, vol. 3, no. 1, Febrero de 2001 (2001-02), páginas 15-24, XP009081554 ISSN: 1464-8431 el documento completo	15

20

Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.

PCT/GB2006/001832

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes			Fecha de publicación
WO 2005112991 A2	01-12-2005	AU	2005244615 A1	01-12-2005	
		CA	2564778 A1	01-12-2005	
		EP	1761275 A2	14-03-2007	
-----	-----	-----	-----	-----	

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference SAC/VB61411	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/GB2006/001832	International filing date (day/month/year) 18/05/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 19/05/2005
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

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

This international search report consists of a total of 10 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
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 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 No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No. 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:

VACCINE COMPOSITION COMPRISING B-SUBUNIT OF E.COLI HEAT TOXIN AND AN ATIGEN
AND AN ADJUVANT

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/GB2006/001832

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
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in electronic 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/GB2006/001832

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:
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:
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:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
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

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

1. claim: 1 to 14 and 16 to 20 (completely) and 15 (partially):

A vaccine composition comprising the B-subunit of E.coli heat labile toxin or derivative thereof with equal or greater than 90% homology complexed with an antigen and an adjuvant, use of said composition for the manufacture of a vaccine and process of production of said vaccine.

2. claim: 15 (partially) :

A vaccine composition comprising a non-live vector derived from a bacterial toxin with an antigen and an adjuvant as far as it does not comprise the B-subunit of E.coli heat labile toxin or derivative thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2006/001832

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/02

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, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCCLUSKIE M J ET AL: "Mucosal immunization of mice using CpG DNA and/or mutants of the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli as adjuvants" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 27, 14 June 2001 (2001-06-14), pages 3759-3768, XP004241795 ISSN: 0264-410X cited in the application the whole document ----- -/--	1,2,6,8, 14-16,20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family 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.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 April 2007

Date of mailing of the international search report

23/05/2007

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hix, Rebecca

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2006/001832

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCCLUSKIE M J ET AL: "Intranasal immunization of mice with CpG DNA induces strong systemic and mucosal responses that are influenced by other mucosal adjuvants and antigen distribution." MOLECULAR MEDICINE (CAMBRIDGE, MASS.) OCT 2000, vol. 6, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 867-877, XP002415521 ISSN: 1076-1551 cited in the application the whole document	1,2,6,8, 14-16,20
X	----- TAMURA ET AL: "Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 12, no. 12, 1994, pages 1083-1089, XP002100633 ISSN: 0264-410X the whole document	1,2,15, 16,20
X	----- TAMURA S ET AL: "Synergistic action of cholera toxin B subunit (and Escherichia coli heat-labile toxin B subunit) and a trace amount of cholera whole toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine." VACCINE APR 1994, vol. 12, no. 5, April 1994 (1994-04), pages 419-426, XP002415522 ISSN: 0264-410X the whole document	1,2,15, 16,20
Y	----- APOSTOLAKI MARIA ET AL: "Nasal delivery of antigen with the B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin augments antigen-specific T-cell clonal expansion and differentiation." INFECTION AND IMMUNITY JUL 2004, vol. 72, no. 7, July 2004 (2004-07), pages 4072-4080, XP002415523 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-20
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2006/001832

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HOLMGREN J ET AL: "MUCOSAL ADJUVANTS AND ANTI-INFECTION AND ANTI-IMMUNOPATHOLOGY VACCINES BASED ON CHOLERA TOXIN, CHOLERA TOXIN B SUBUNIT AND CPG DNA" EXPERT REVIEW OF VACCINES, FUTURE DRUGS, LONDON, GB, vol. 2, no. 2, April 2003 (2003-04), pages 205-217, XP009060650 ISSN: 1476-0584	1-20
X	the whole document	15
Y	HU K-F ET AL: "Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, AMSTERDAM, NL, vol. 51, 2001, pages 149-159, XP002980025 ISSN: 0169-409X	1-20
X	the whole document	15
P,Y	WO 2005/112991 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; CHOMEZ PATRICK [BE]; COLLIGNON CATHERI) 1 December 2005 (2005-12-01) cited in the application the whole document	1-20
A	SIXMA T K ET AL: "Lactose binding to heat-labile enterotoxin revealed by X-ray crystallography." NATURE 6 FEB 1992, vol. 355, no. 6360, 6 February 1992 (1992-02-06), pages 561-564, XP002415524 ISSN: 0028-0836 the whole document	
X	MCCLUSKIE M J ET AL: "CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen [published erratum appears in J Immunol 1999 Mar 1]" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 161, no. 9, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 4463-4466, XP002125530 ISSN: 0022-1767 the whole document	15
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2006/001832

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LYCKE NILS: "From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM." CELLULAR MICROBIOLOGY JAN 2004, vol. 6, no. 1, January 2004 (2004-01), pages 23-32, XP002431449 ISSN: 1462-5814 the whole document	15
X	CHOI A H ET AL: "The level of protection against rotavirus shedding in mice following immunization with a chimeric VP6 protein is dependent on the route and the coadministered adjuvant" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 13-14, 15 March 2002 (2002-03-15), pages 1733-1740, XP004366009 ISSN: 0264-410X the whole document	15
X	OLSZEWSKA W ET AL: "Antipeptide antibody responses following intranasal immunization: effectiveness of mucosal adjuvants." INFECTION AND IMMUNITY SEP 2000, vol. 68, no. 9, September 2000 (2000-09), pages 4923-4929, XP002431450 ISSN: 0019-9567 the whole document	15
X	VAJDY M ET AL: "Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines" IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY, CARLTON, AU, vol. 82, no. 6, December 2004 (2004-12), pages 617-627, XP002370291 the whole document	15
Y	FREIDAG B L ET AL: "CpG oligodeoxynucleotides and interleukin-12 improve the efficacy of Mycobacterium bovis BCG vaccination in mice challenged with M. tuberculosis." INFECTION AND IMMUNITY MAY 2000, vol. 68, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 2948-2953, XP002431451 ISSN: 0019-9567 the whole document	15
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2006/001832

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ARRINGTON J ET AL: "Plasmid vectors encoding cholera toxin or the heat-labile enterotoxin from Escherichia coli are strong adjuvants for DNA vaccines" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 76, no. 9, May 2002 (2002-05), pages 4536-4546, XP002379962 ISSN: 0022-538X the whole document -----	15
Y	HOLMGREN JAN ET AL: "Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges." VACCINE 1 JUN 2003, vol. 21 Suppl 2, 1 June 2003 (2003-06-01), pages S89-S95, XP002431452 ISSN: 0264-410X the whole document -----	15
Y	LEE JOHN S ET AL: "Viral vectors for use in the development of biodefense vaccines." ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS 17 JUN 2005, vol. 57, no. 9, 15 April 2005 (2005-04-15), pages 1293-1314, XP002431453 ISSN: 0169-409X the whole document -----	15
Y	KRIEG A M ET AL: "ENHANCING VACCINES WITH IMMUNE STIMULATORY CPG DNA" CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, CURRENT DRUGS, LONDON,, GB, vol. 3, no. 1, February 2001 (2001-02), pages 15-24, XP009081554 ISSN: 1464-8431 the whole document -----	15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2006/001832

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005112991 A2	01-12-2005	AU 2005244615 A1	01-12-2005
		CA 2564778 A1	01-12-2005
		EP 1761275 A2	14-03-2007

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
23 de Noviembre de 2006 (23.11.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/123155 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/02 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/GB2006/001832

(22) Fecha de Registro Internacional:
18 de Mayo de 2006 (18.05.2006)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
0510280.1 19 de Mayo de 2005 (19.05.2005) GB
0524407.4 30 de Noviembre de 2005 (30.11.2005) GB

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

(71) Solicitante (para Madagascar solamente): **GLAXO GROUP LIMITED** [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventor; e
(75) Inventor/Solicitante (para Estados Unidos de América solamente): **DEWERCHIN, Marianne** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., 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, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, 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, LV, 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:

- en cuanto al derecho del solicitante de solicitar y obtener una patente (Regla 4.17(ii))
- en cuanto al derecho del solicitante de reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))
- de invención (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- 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:
19 de Julio de 2007

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

(54) Título: COMPOSICIÓN DE VACUNA QUE COMPRENDE SUBUNIDAD B DE TERMO TOXINA E. COLI Y UN ANTÍGENO Y UN ADYUVANTE

(57) Resumen: La presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende la subunidad B de toxina termo-lábil de *E. coli* o un derivado de la misma con homología igual o mayor de 90% complejada con un antígeno y un adyuvante.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 November 2006 (23.11.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/123155 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/02 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/GB2006/001832

(22) International Filing Date: 18 May 2006 (18.05.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0510280.1 19 May 2005 (19.05.2005) GB
0524407.4 30 November 2005 (30.11.2005) GB

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

(71) Applicant (for MG only): GLAXO GROUP LIMITED [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): DEWERCHIN, Marianne [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue De L'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agent: CHIAPPINELLI, Susan, 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, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, 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) 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, LV, 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).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

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

(88) Date of publication of the international search report:
19 July 2007

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

(54) Title: VACCINE COMPOSITION COMPRISING B-SUBUNIT OF E. COLI HEAT TOXIN AND AN ATIGEN AND AN ADJUVANT

(57) Abstract: The present invention provides a vaccine composition comprising the B-subunit of *E. coli* heat labile toxin or a derivative thereof with equal or greater than 90% homology complexed with an antigen and an adjuvant.

WO 2006/123155 A3

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES

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. PCT/GB2006/001832	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 18.05.2006	Fecha de prioridad (día/mes/año) 19.05.2005	
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV. A61K39/02			
Solicitante GLAXOSMITHKLIN E BIOLOGICALS S.A.			
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: ☒ Casilla No. I Bases de la opinión ☒ Casilla No. II Prioridad ☒ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial ☒ Casilla No. IV Falta de unidad de invención ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación ☒ Casilla No. VI Ciertos documentos citados ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional ☐ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional 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 - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Fecha de terminación de esta opinión ver forma PCT/ISA/210	Funcionario Autorizado Hix, Rebecca Teléfono No. +31 70 340-3898	

Casilla No. I Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión ha sido establecida sobre las bases de:
☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó

☐ una traducción de la solicitud internacional en , el cual es el idioma de una traducción proporcionada para los propósitos de búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) 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:

Casilla No. II Prioridad

1. ☒ La validez de la reivindicación de prioridad no ha sido considerada ya que la Autoridad de Búsqueda Internacional no tiene a su disposición una copia de la solicitud anterior cuya prioridad ha sido reivindicada o, donde sea necesario, una traducción de la solicitud anterior. Sin embargo, esta opinión ha sido establecida bajo la suposición que la fecha relevante (Reglas 43bis.1 y 64.1) es la fecha de prioridad reivindicada.
2. ☐ Esta opinión ha sido establecida como sino se hubiera reclamado prioridad debido a que la reivindicación de prioridad ha sido encontrada inválida (Reglas 43bis.1 y 64.1). De esta manera, para los propósitos de esta opinión, la fecha de presentación internacional indicada arriba es considerada la fecha relevante.
3. Observaciones adicionales, de ser necesario:

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. 18, 19

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 18, 19 se refieren a la siguiente materia objeto la cual no requiere un examen preliminar internacional (*especificar*):

ver hoja separada

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos. son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especificar*):
- ☐ 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.
- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin el listado de secuencia; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:
- ☐ suministró un listado de secuencias en papel para cumplir con el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
- ☐ suministró un listado de secuencias en formato electrónico para cumplir en el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas y tal listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
- ☐ pagó la tarifa de suministro tardío para el suministro de un listado de secuencia en respuesta a una invitación de acuerdo con las Reglas 13ter.1(a) o (b).
- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con los listados de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no suministró dichas tablas en formato electrónico para cumplir con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas y dichas tablas no estuvieron disponibles para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
- ☐ las tablas que se relacionan con el listado de secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos, si están solamente en formato electrónico, no cumplen con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver Casilla Suplementaria para detalles adicionales

Casilla No. IV Falta de unidad de invención

1. ☒ En respuesta a la invitación (Forma PCT/ISA/206) para pagar derechos adicionales, el solicitante ha, dentro del límite de tiempo aplicable:
- ☒ pagado derechos adicionales.
 - ☐ pagado derechos adicionales bajo protesta y, donde aplique, el derecho de protesta.
 - ☐ pagado derechos adicionales bajo protesta pero el derecho de protesta aplicable no pagado.
 - ☐ no pagado derechos adicionales.
2. ☐ Esta Autoridad encontró que el requisito de unidad de invención no se ha cumplido y escogió no invitar al solicitante para que pague derechos adicionales.
3. Esta Autoridad considera que el requisito de unidad de invención de acuerdo con las Reglas 13.1, 13.2 y 13.3 es
- ☐ se ha cumplido.
 - ☒ no se ha cumplido por las siguientes razones:

ver hoja separada
4. Por consiguiente, este reporte ha sido establecido con respecto a las siguientes partes de la solicitud internacional:
- ☒ todas las partes.
 - ☐ las partes que se relacionan con las reivindicaciones Nos.

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

1. Declaración
- | | |
|-------------------------------|---|
| Novedad (N) | Si: Reivindicaciones <u>3-5, 7, 9-13, 17-19</u> |
| | No: Reivindicaciones <u>1, 2, 6, 8, 14-16, 20</u> |
| Nivel Inventivo (IS) | Si: Reivindicaciones |
| | No: Reivindicaciones <u>1-20</u> |
| Aplicabilidad Industrial (IA) | Si: Reivindicaciones <u>1-7, 20</u> |
| | No Reivindicaciones |
2. Citaciones y explicaciones
- ver hoja separada

Casilla No. VI Ciertos documentos citados

1. Ciertos documentos publicados (Reglas 43*bis*.1 y 70.10)

y/o

2. Descripciones no escritas (Reglas 43*bis*.1 y 70.9)

ver forma 210

Re Ítem III

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

Las reivindicaciones 18 y 19 se relacionan con la materia objeto que esta Autoridad considera que está cubierta por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) PCT).

Re Ítem IV

Falta de unidad de invención

Las invenciones/grupos de invención separados son:

Invención 1: Reivindicaciones 1 a 14 y 16 a 20 (completamente):

Una composición de vacuna que comprende la subunidad B de la toxina termolábil de E.coli o derivados de la misma con una homología igual o mayor al 90% acompañada con un antígeno y un adyuvante, uso de dicha composición para la fabricación de una vacuna y proceso de producción de dicha vacuna.

Invención 2: Reivindicación 15 (completamente):

Una composición de vacuna que comprende un vector no vivo derivado de una toxina bacteriana con un antígeno y un adyuvante, en cuanto no comprende la subunidad B de la toxina termolábil de E.coli o derivados de la misma.

Las invenciones anteriores no están así ligadas como para formar un solo concepto inventivo general simple (Regla 13.1 PCT) por las siguientes razones:

El problema técnico común que une a la Invención 1 y a la Invención 2 comprende una composición de vacuna que comprende una toxina bacteriana con un antígeno y un adyuvante.

Este problema ya es conocido de los documentos de la técnica anterior;

D1: MCCLUSKIE M J ET AL: "Inmunización mucosa de ratones usando CpG ADN y/o mutantes de la enterotoxina termolábil de Escherichia coli como adyuvantes" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILFORD, GB, vol. 19, no. 27, 14 de Junio de 2001 (2001-06-14), páginas 3759-3768, XP004241795 ISSN: 0264-410X citado en la solicitud y

D2: MCCLUSKIE M J ET AL: "Inmunización intranasal de ratones con CpG ADN induce respuestas sistémicas y mucosales fuertes que son influenciadas por otros adyuvantes mucosales y distribución de antígenos". MOLECULAR MEDICINE (CAMBRIDGE, MASS.) OCT 2000, vol. 6, no. 10, Octubre de 2000 (2000-10), páginas 867-877, XP002415521 ISSN: 1076-1551 citado en la solicitud.

D1 revela la combinación de oligodeoxinucleótidos CpG (ODN) con la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* LT (LTh) nativa, la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB), varios mutantes activos en el sitio (LTE112K LTA69G, LTS61F) y un mutante de proteasa en el sitio de LT (LTR192G) usando entrega intranasal (IN) u oral a ratones de antígeno de hepatitis B (HbsAg) o toxoide de tétano (TT).

D2 evalúa CpG ODN con entrega IN de HbsAg purificado en combinación con toxina de cólera (CT), LT, subunidad B de CT, CTB y un derivado no tóxico de LTK63.

El problema técnico común es conocido en el estado de la técnica. Las dos invenciones tratan problemas técnicos diferentes donde las soluciones comprenden características técnicas diferentes. Parece que no hay características técnicas en común entre los problemas y soluciones diferentes de las invenciones separadas que podrían proporcionar un concepto unificador novedoso e inventivo.

Por consiguiente, la unidad de invención requerida (Regla 13.1 PCT) por lo tanto ya no existe en cuanto a que una relación técnica que comprende uno o más del mismo o características especiales correspondientes en el sentido de la Regla 13.2 PCT no existe entre la materia objeto de los grupos de reivindicaciones.

Re Ítem V

Afirmación razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; menciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación respecto a:

Invención 1: Reivindicaciones 1 a 14 y 16 a 20 (completamente) y reivindicación 15 (parcialmente): Una composición de vacuna que comprende la subunidad B de la toxina termolábil de *E.coli* o derivados de la misma con una homología igual o mayor al 90% acomplejada con un antígeno y un adyuvante, uso de dicha composición para la fabricación de una vacuna y proceso de producción de dicha vacuna.

- 1 Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 16 a 19 sobre la pregunta de si son aplicables industrialmente, no existen criterios unificados en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente la materia objeto de las reivindicaciones en cuanto al uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en el tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.
- 2 Se hace referencia a los siguientes **documentos** en esta comunicación; la numeración se adherirá en el resto del procedimiento:
 - D1: MCCLUSKIE M J ET AL: "Inmunización mucosal de ratones usando CpG ADN y/o mutantes de la enterotoxina termolábil de Escherichia coli como adyuvantes" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILFORD, GB, vol. 19, no. 27, 14 de Junio de 2001 (2001-06-14), páginas 3759-3768, XP004241795 ISSN: 0264-410X citado en la solicitud
 - D2: MCCLUSKIE M J ET AL: "La inmunización intranasal de ratones con CpG ADN induce respuestas sistémicas y mucosales fuertes que son influenciadas por otros adyuvantes mucosales y distribución de antígenos". MOLECULAR MEDICINE (CAMBRIDGE, MASS.) OCT 2000, vol. 6, no. 10, Octubre de 2000 (2000-10), páginas 867-877, XP002415521 ISSN: 1076-1551 citado en la solicitud
 - D3: TAMURA ET AL: "Enterotoxina termolábil de Escherichia coli con subunidades B suplementadas con una cantidad traza de la holotoxina como un adyuvante para la vacuna de influenza nasal" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILFORD, GB, vol. 12, no. 12, 1994, páginas 1083-1089, XP002100633 ISSN: 0264-410X
 - D4: TAMURA S ET AL: "Acción sinérgica de la subunidad B de la toxina de cólera (y de la subunidad B de toxina termolábil de Escherichia coli) y una cantidad traza de la toxina completa de cólera como un adyuvante para la vacuna de influenza nasal". VACCINE ABR 1994, vol. 12, no. 5, Abril de 1994, (1994-04), páginas 419-426, XP002415522 ISSN: 0264-410X

- D5: APOSTOLAKI MARIA J ET AL: "La entrega nasal de antígeno con la subunidad B de enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* aumenta la expansión y diferenciación clonal de células T específicas al antígeno". INFECTION AND IMMUNITY JUL 2004, vol. 72, no. 7, Julio de 2004 (2004-07), páginas 4072-4080, XP002415523 ISSN: 0019-9567
- D6: HOLMGREN J ET AL: "ADYUVANTES MUCOSALES Y VACUNAS ANTI-INFECCION Y ANTI-INMUNOPATOLOGÍA CON BASE EN TOXINA DE COLERA, SUBUNIDAD B DE TOXINA DE COLERA Y CPG ADN" EXPERT REVIEW OF VACCINES, FUTURE DRUGS, LONDRES, GB, vol. 2, no. 2, Abril de 2003 (2003-04), páginas 205-217, XP009060650 ISSN: 1476-0584
- D7: HU K-F ET AL: "Complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) para vacunación nasal" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEW, ÁMSTERDAM, NL, vol. 51, 2001, páginas 149-159, XP002980025 ISSN: 0169-409X

3 **NOVEDAD** (Artículo 33(2) PCT)

- 3.1 D1 revela la combinación de oligodeoxinucleótidos CpG (ODN) con la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* LT (LTh) nativa, la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB), varios mutantes activos en el sitio (LTE112K, LTA69G, LTS61F) y un mutante de proteasa en el sitio de LT (LTR192G) usando entrega intranasal (IN) u oral a ratones con antígeno de hepatitis B (HbsAg) o toxoide de tétano (TT).
- 3.2 D2 evalúa CpG ODN con entrega IN de HbsAg en combinación con toxina de cólera (CT), LT, subunidad B de CT, CTB y un derivado no tóxico de LTK63.
- 3.3 La presente solicitud no cumple con los requerimientos del Artículo 33(2) PCT porque a la luz de las revelaciones de D1 y D2 la materia objeto de las reivindicaciones 1, 2, 6, 8, 14 a 16 y 20 no es nueva.
- 3.4 D3 describe LTB suplementado con una cantidad traza de la holotoxina LT administrada con hemaglutinina inactivada (HA) usada para vacunar ratones Balb/C.

Se observó un efecto adyuvante sinérgico cuando LTB fue complementado con 0.2-2ng LT.

- 3.5 D4 describe LTB suplementado con una cantidad traza de toxina de cólera (CT) administrada con hemaglutinina inactivada (HA) como una vacuna en ratones Balb/c. Se observó un efecto sinérgico entre LTB y CT.
- 3.6 A la luz de D3 y D4, la materia objeto de las reivindicaciones 1, 2, 15, 16 y 20 no es nueva de conformidad con el Artículo 33(2) PCT.
- 3.7 En vista de la técnica anterior citada, las reivindicaciones 3 a 5, 7, 9 a 13 y 17 a 19 parecen ser novedosas y cumplir por lo tanto con los requerimientos del Artículo 33(2) PCT puesto que la técnica anterior no revela composiciones de vacuna que comprendan la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* acomplexada o unida como una proteína de fusión con un antígeno y los adyuvantes definidos de conformidad con la reivindicación 3.
- 4 NIVEL INVENTIVO (Artículo 33(3) PCT)
- 4.1 Se considera que el documento D1 representa el estado de la técnica más relevante y revela la coadministración de CpG ODN con LTB para la entrega de HbsAg o TT.
- 4.2 La materia objeto de las reivindicaciones 3 a 5, 7 a 11 y 17 a 19 difiere en que diferentes adyuvantes son combinados con LTB lo que resulta en un efecto sinérgico.
- 4.3 El problema que la presente invención pretende resolver puede por lo tanto ser considerado como proporcionar una composición de vacuna LTB alternativa.
- 4.4 D1 concluye que en la mayoría de los casos no se encontró sinergia entre los derivados de CpG y LT debido a la fuerza de la respuesta tumoral. "Sin embargo ... CpG ODN combinado con cualquier derivado de LT indujo a respuestas más del Tipo 1 que a derivados LT solos", ver también la Fig. 1.
- 4.5 D5 reporta la coadministración de LTB con ovalbúmina lo que resulta en aumento en la proliferación de células T y respuesta sistémica de los anticuerpos contra los antígenos.

- 4.6 D6 demuestra que la combinación de los adyuvantes mucosales tales como ligandos del receptor tipo Toll con la subunidad B (CTB) de la toxina de cólera que resulta en actividad inmunoestimuladora potente.
- 4.7 D7 comprende CTB incorporado en un complejo inmunoestimulante (ISCOM) junto con saponinas que resultan en más de 10 respuestas IgA a CTB en los pulmones.
- 4.8 A la luz de la técnica anterior, la persona versada en la técnica consideraría combinar LTB con adyuvantes alternativos que mejoran la respuesta inmune del CTB estrechamente relacionado, con la expectativa de lograr una respuesta inmune mejorada sinérgicamente.
- 4.9 De hecho, la descripción de la presente solicitud, página 34, líneas 14 a 16 indica que las enseñanzas de WO2005/112991 (documento intermedio) que comprende StxB-Ova puede ser extrapolado para combinar los antígenos y adyuvantes LTB.
- 4.10 Por lo tanto, la combinación de TLB con un antígeno y adyuvantes tales como ligandos del receptor tipo Toll, saponinas u otros adyuvantes conocidos o se considera que la combinación del antígeno como una proteína de fusión con el TLB es una combinación obvia de componentes conocidos que funcionan de manera predecible y por lo tanto no garantizan el reconocimiento de un nivel inventivo de conformidad con el Artículo 33(3) PCT.
- 4.11 En vista de lo anterior, la presente solicitud no cumple con los requerimientos del Artículo 33(3) PCT porque la materia objeto de las reivindicaciones 3 a 5, 7, 9 a 13 y 17 a 19 no comprende un nivel inventivo.

Invención 2: Reivindicación 15 (completamente):

Una composición de vacuna que comprende un vector no vivo derivado de una toxina bacteriana con un antígeno y un adyuvante, en cuanto no comprende la subunidad B de la toxina termolábil de E.coli o derivados de la misma.

- 1 Se hace referencia a los siguientes **documentos** en esta comunicación; la numeración se adherirá en el resto del procedimiento:
 - D1: MCCLUSKIE M J ET AL: "CpG ADN es un mejorador potente de inmunidad específica en ratones inmunizados con antígeno de superficie de hepatitis B recombinante [aparece una fe de errata publicada en J Immunol 1999 Marzo 1" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US. vol. 161, no. 9, 1 de Noviembre de 1998 (1998-11-01), páginas 4463-4466, XP002125530 ISSN: 0022-1767
 - D2: LYCKE NILS: "De toxina a adyuvante: el diseño racional de un vector adyuvante de vacuna, CTA1-DD/ISCOM". CELLULAR MICROBIOLOGY ENERO 2004, vol. 6, no. 1, Enero de 2004 (2004-01), páginas 23-32, XP002431449 ISSN: 1462-5814
 - D3: CHOI A H ET AL: "El nivel de protección contra pérdida de rotavirus en ratones después de la inmunización con una proteína VP6 quimérica depende de la ruta y del adyuvante coadministrado" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 13-14, 15 de Marzo de 2002 (2002-03-15) páginas 1733-1740 XP004366009 ISSN: 0264-410X
 - D4: OLSZEWSKA W ET AL: "Respuestas de anticuerpo antipeptido después de la inmunización intranasal: efectividad de los adyuvantes mucosales". INFECTION AND IMMUNITY SEP 2000, vol. 68, no. 9, Septiembre de 2000, (2000-09), páginas 4923-4929, XP002431450 ISSN: 0019-9567
- 2 La reivindicación 15 comprende una composición de vacuna que comprende los siguientes tres componentes:
 - I.) un vector no vivo derivado de una toxina bacterial
 - ii.) un antígeno y
 - iii.) un adyuvantedonde el vector no vivo de conformidad con la descripción, página 3, se basa en toxinas detoxificadas
- 3 Las composiciones de vacuna que comprenden los tres componentes anteriores son conocidas comúnmente en el estado de la técnica;

- 3.1 D1 comprende subunidades de vacunas que comprenden i) toxina de cólera (CT) administrada con ii.) antígeno de superficie de hepatitis B (HbsAg) y iii.) motivos inmunoestimulatorios CpG.
- 3.2 D2 revela la combinación de CTA1-DD e ISCOMs en un vector adyuvante de vacuna, donde i.) CTA-1 es la toxina de cólera combinada con ii.) subunidad CTA-1 activa enzimáticamente con una mitad que tiene un objetivo de célula B a partir de la proteína A del Staphylococcus aureus y el ISCOMs que contiene el iii.) adyuvante Quil A.
- 3.3 D3 comprende inmunización con MBP::VP6 en combinación con varios adyuvantes incluyendo CTA1-DD, QS-21 y CpG ODN.
- 3.4 D4 describe la coadministración de un inmunógeno péptido sintético MAP-M2 junto con motivos CpG y un mutante de enterotoxina tipo silvestre de E.coli LTR72.
- 4 A la luz de las revelaciones de los documentos de la técnica anterior, se conocen composiciones de vacuna que comprenden los tres componentes según se definen ampliamente de conformidad con la reivindicación 15.
- 5 La materia objeto de la reivindicación 15 por lo tanto no es novedosa de conformidad con el Artículo 33(2) PCT.

Re Ítem VI
Ciertos documentos citados

Ciertos documentos publicados			
Solicitud No.	Fecha de publicación	Fecha de radicación	Fecha de prioridad (<i>reivindicación válida</i>)
Patente No.	(<i>día/mes/año</i>)	(<i>día/mes/año</i>)	(<i>día/mes/año</i>)
WO 2005/112991	1.12.2005	19.5.2005	21.5.2004

Re Ítem VIII
Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

6 **CLARIDAD** (Artículo 6 PCT)

- 6.1 Las reivindicaciones 14 y 17 no cumplen con los requerimientos del Artículo 6 PCT en que la materia para la cual se busca protección no está definida. Las reivindicaciones intentan definir la materia objeto en términos del resultado que pretende ser logrado, es decir: selección de los antígenos de un grupo de antígenos que "proporcionan inmunidad contra el grupo de enfermedades seleccionadas de...", reivindicación 14. Reivindicación 17 "...para obtener una respuesta de un antígeno específico CD8"
- 6.2 Los términos "agonista" usada en la reivindicación 5 "un vector no vivo" y "derivado funcional inmunológicamente de la misma" en la reivindicación 15 son vagos e indefinidos y como tal hacen confuso el alcance de las reivindicaciones; en concordancia, la reivindicación requiere modificación para eliminar este defecto (Artículo 6 PCT).
- 6.3 Además, la reivindicación 15 está tan ampliamente formulada como para comprender un "vector no vivo" derivado de una toxina bacterial" en combinación con un antígeno y un adyuvante. La descripción por lo tanto se limita a ejemplos particulares. Por lo tanto, se considera que la materia objeto de la reivindicación 15 no está sustentada por los detalles técnicos a través de todo el alcance de la reivindicación, contrario a los requerimientos del Artículo 6 PCT.

PATENT COOPERATION TREATY

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/GB2006/001832

International filing date (day/month/year)
18.05.2006

Priority date (day/month/year)
19.05.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/02

Applicant
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

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") except that 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 66.1bis(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 3 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 - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

See form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Hix, Rebecca

Telephone No. +31 70 340-3898



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2006/001832

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
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) 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:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic 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:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2006/001832

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. 18, 19

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 18, 19 relate to the following subject matter which does not require an international search (*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 (*specify*):

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13~~ter~~.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

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

☐ See Supplemental Box for further details

20

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/GB2006/001832

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☒ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

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	<u>3-5, 7, 9-13, 17-19</u>
	No: Claims	<u>1, 2, 6, 8, 14-16, 20</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-20</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-7, 20</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2006/001832

Box No. VI Certain documents cited

- 1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)
and /or
- 2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)
see form 210

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 18 and 19 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).

Re Item IV

Lack of unity of invention

The separate inventions/groups of invention are:

Invention 1: Claims 1 to 14 and 16 to 20 (completely):

A vaccine composition comprising the B-subunit of E.coli heat labile toxin or derivative thereof with equal or greater than 90% homology complexed with an antigen and an adjuvant, use of said composition for the manufacture of a vaccine and process of production of said vaccine.

Invention 2: Claim 15 (completely) :

A vaccine composition comprising a non-live vector derived from a bacterial toxin with an antigen and an adjuvant, as far as it does not comprise the B-subunit of E.coli heat labile toxin or derivative thereof.

The above inventions are not so linked as to form a single general inventive concept (Rule 13.1 PCT) for the following reasons:

The common technical problem linking Invention 1 and Invention 2 involves a vaccine composition comprising a bacterial toxin with an antigen and an adjuvant.

This problem is already known from the following prior art documents;

D1: MCCLUSKIE M J ET AL: "Mucosal immunization of mice using CpG DNA and/or mutants of the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli as adjuvants" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 27, 14 June 2001 (2001-06-14), pages 3759-3768, XP004241795 ISSN: 0264-410X cited in the application and

D2: MCCLUSKIE M J ET AL: "Intranasal immunization of mice with CpG DNA induces

strong systemic and mucosal responses that are influenced by other mucosal adjuvants and antigen distribution." MOLECULAR MEDICINE (CAMBRIDGE, MASS.) OCT 2000, vol. 6, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 867-877, XP002415521 ISSN: 1076-1551 cited in the application.

D1 discloses the combination of CpG oligodeoxynucleotides (ODN) with the native *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LT (LT_h), the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB), various active site mutants (LTE112K, LTA69G, LTS61F) and a protease site mutant of LT (LTR192G) using intranasal (IN) or oral delivery to mice of hepatitis B antigen (HBsAg) or tetanus toxoid (TT).

D2 evaluates CpG ODN with IN delivery of purified HbsAg in combination with cholera toxin (CT), LT, B subunit of CT, CTB and a non toxic derivative of LTK63.

The common technical problem is known in the state of the art. The two inventions deal with different technical problems where the solutions involve different technical features. There appears to be no technical features in common between the different problems and solutions of the separate inventions that could provide a novel and inventive unifying concept.

Consequently, the requisite unity of invention (Rule 13.1 PCT) therefore no longer exists inasmuch as a technical relationship involving one or more of the same or corresponding special technical features in the sense of Rule 13.2 PCT does not exist between the subject-matter of the groups of claims.

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement with respect to:

Invention 1: Claims 1 to 14 and 16 to 20 (completely) and claim 15 (partially):
A vaccine composition comprising the B-subunit of E.coli heat labile toxin or derivative thereof with equal or greater than 90% homology complexed with an antigen and an

adjuvant, use of said composition for the manufacture of a vaccine and process of production of said vaccine.

- 1 For the assessment of the present claims 16 to 19 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.
- 2 The following **documents** are referred to in this communication; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure:
 - D1: MCCLUSKIE M J ET AL: "Mucosal immunization of mice using CpG DNA and/or mutants of the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli as adjuvants" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 27, 14 June 2001 (2001-06-14), pages 3759-3768, XP004241795 ISSN: 0264-410X cited in the application
 - D2: MCCLUSKIE M J ET AL: "Intranasal immunization of mice with CpG DNA induces strong systemic and mucosal responses that are influenced by other mucosal adjuvants and antigen distribution." MOLECULAR MEDICINE (CAMBRIDGE, MASS.) OCT 2000, vol. 6, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 867-877, XP002415521 ISSN: 1076-1551 cited in the application
 - D3: TAMURA ET AL: "Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 12, no. 12, 1994, pages 1083-1089, XP002100633 ISSN: 0264-410X
 - D4: TAMURA S ET AL: "Synergistic action of cholera toxin B subunit (and Escherichia coli heat-labile toxin B subunit) and a trace amount of cholera whole toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine." VACCINE APR

1994, vol. 12, no. 5, April 1994 (1994-04), pages 419-426, XP002415522
ISSN: 0264-410X

- D5: APOSTOLAKI MARIA ET AL: "Nasal delivery of antigen with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin augments antigen-specific T-cell clonal expansion and differentiation." INFECTION AND IMMUNITY JUL 2004, vol. 72, no. 7, July 2004 (2004-07), pages 4072-4080, XP002415523 ISSN: 0019-9567
- D6: HOLMGREN J ET AL: "MUCOSAL ADJUVANTS AND ANTI-INFECTION AND ANTI-IMMUNOPATHOLOGY VACCINES BASED ON CHOLERA TOXIN, CHOLERA TOXIN B SUBUNIT AND CPG DNA" EXPERT REVIEW OF VACCINES, FUTURE DRUGS, LONDON, GB, vol. 2, no. 2, April 2003 (2003-04), pages 205-217, XP009060650 ISSN: 1476-0584
- D7: HU K-F ET AL: "Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, AMSTERDAM, NL, vol. 51, 2001, pages 149-159, XP002980025 ISSN: 0169-409X

3 NOVELTY (Art. 33(2) PCT)

- 3.1 D1 discloses the combination of CpG oligodeoxynucleotides (ODN) with the native *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LT (LTh), the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB), various active site mutants (LTE112K, LTA69G, LTS61F) and a protease site mutant of LT (LTR192G) using intranasal (IN) or oral delivery to mice of hepatitis B antigen (HBsAg) or tetanus toxoid (TT).
- 3.2 D2 evaluates CpG ODN with IN delivery of purified HbsAg in combination with cholera toxin (CT), LT, B subunit of CT, CTB and a non toxic derivative of LTK63.
- 3.3 The present application does not meet the requirements of Article 33(2) PCT because in the light of the disclosures of D1 and D2 the subject-matter of claims 1, 2, 6, 8, 14 to 16 and 20 is not new.
- 3.4 D3 describes LTB supplemented with a trace amount of the holotoxin LT administered with inactivated haemagglutinin (HA) used to vaccinate Balb/c mice.

A synergistic adjuvant effect was observed when the LTB was supplemented with 0.2-2ng LT.

- 3.5 D4 describes LTB supplemented with a trace amount of cholera toxin (CT) administered with inactivated haemagglutinin (HA) as a vaccine in Balb/c mice. A synergistic effect was observed between LTB and CT.
- 3.6 In the light of D3 and D4, the subject-matter of claims 1, 2, 15, 16 and 20 is not new according to Article 33(2) PCT.
- 3.7 In view of the prior art cited, claims 3 to 5, 7, 9 to 13 and 17 to 19 appear to be novel and meet therefore the requirements of Art. 33(2) PCT since the prior art does not disclose vaccine compositions comprising the B-subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin complexed or joined as a fusion protein with an antigen and the adjuvants defined according to claim 3.

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

- 4.1 Document D1 is considered to represent the most relevant state of the art and discloses the coadministration of CpG ODN with LTB for the delivery of HbsAg or TT.
- 4.2 The subject-matter of claims 3 to 5, 7 to 11 and 17 to 19 differ in that different adjuvants are combined with the LTB resulting in a synergistic effect.
- 4.3 The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing an alternative LTB vaccine composition.
- 4.4 D1 concludes that in most cases no synergy between CpG and LT derivatives was found for strength of the humoral response. "Nevertheless ... CpG ODN combined with any LT derivative induced a more Type 1-like response than LT derivative alone", see also Fig. 1.
- 4.5 D5 reports the coadministration of LTB with ovalbumin resulting in increased T-cell

proliferation and systemic antibody response against antigens.

- 4.6 D6 demonstrates that the combination of mucosal adjuvants such as Toll-like receptor ligands with cholera toxin B subunit (CTB) resulting in potent immunostimulatory activity.
- 4.7 D7 involves CTB incorporated in immunostimulating complex (ISCOM) together with saponins resulting in a more than 10-fold IgA response to CTB in the lungs.
- 4.8 In the light of the above prior art, the person skilled in the art would consider combining LTB with alternative adjuvants known to enhance the immune response of the closely related CTB, with the expectation of achieving a synergistically enhanced immune response.
- 4.9 In fact the description of the present application, page 34, lines 14 to 16 states that the teachings of WO2005/112991 (intermediate document) involving StxB-Ova may be extrapolated to combine LTB the antigens and adjuvants.
- 4.10 Thus the combination of TLB with an antigen and adjuvants such as Toll-like receptor ligands, saponins or other known adjuvants or combining the antigen as a fusion protein with the TLB is considered an obvious combination of known components functioning in a predictable manner and therefore not warranting recognition of an inventive step according to Article 33(3) PCT.
- 4.11 In view of the above, the present application does not meet the requirements of Article 33(3) PCT, because the subject-matter of claims 3 to 5 , 7, 9 to 13 and 17 to 19 does not involve an inventive step.

Invention 2: Claim 15 (completely) :

A vaccine composition comprising a non-live vector derived from a bacterial toxin with an antigen and an adjuvant, as far as it does not comprise the B-subunit of E.coli heat labile toxin or derivative thereof.

- 1 The following **documents** are referred to in this communication; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure:

- D1: MCCLUSKIE M J ET AL: "CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen [published erratum appears in J Immunol 1999 Mar 1" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 161, no. 9, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 4463-4466, XP002125530 ISSN: 0022-1767
- D2: LYCKE NILS: "From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM." CELLULAR MICROBIOLOGY JAN 2004, vol. 6, no. 1, January 2004 (2004-01), pages 23-32, XP002431449 ISSN: 1462-5814
- D3: CHOI A H ET AL: "The level of protection against rotavirus shedding in mice following immunization with a chimeric VP6 protein is dependent on the route and the coadministered adjuvant" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 13-14, 15 March 2002 (2002-03-15), pages 1733-1740, XP004366009 ISSN: 0264-410X
- D4: OLSZEWSKA W ET AL: "Antipeptide antibody responses following intranasal immunization: effectiveness of mucosal adjuvants." INFECTION AND IMMUNITY SEP 2000, vol. 68, no. 9, September 2000 (2000-09), pages 4923-4929, XP002431450 ISSN: 0019-9567

- 2 Claim 15 involves a vaccine composition comprising the following three components;
- i.) a non-live vector derived from a bacterial toxin
 - ii.) an antigen and
 - iii.) an adjuvant
- where the non-live vector according the description, page 3, is based on detoxified toxins.
- 3 Vaccine compositions comprising the above three components are commonly known in the state of the art;

- 3.1 D1 involves subunit vaccines comprising i) cholera toxin (CT) administered with ii.) hepatitis B surface antigen (HbsAg) and iii.) immunostimulatory CpG motifs.
- 3.2 D2 discloses the combination of CTA1-DD and ISCOMs into a vaccine adjuvant vector, where i.) CTA-1 is the cholera toxin combine with the ii.) enzymatically active CTA-1 subunit with a B cell targeting moiety D from Staphylococcus aureus protein A and the ISCOMs containing the iii.) adjuvant Quil A.
- 3.3 D3 involves immunization with MBP::VP6 in combination with various adjuvants including CTA1-DD, QS-21 and CpG ODN.
- 3.4 D4 describes the coadministration of a synthetic peptide immunogen MAP-M2 together with CpG motifs and a mutant of wild-type enterotoxin of E.coli LTR72.
- 4 In the light of the disclosures of the above prior art documents, vaccine compositions comprising the three components as broadly defined according to claim 15 are known.
- 5 The subject-matter of claim 15 is therefore not novel according to Article 33(2) PCT.

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO 2005/112991	1.12.2005	19.5.2005	21.5.2004

Re Item VIII

Certain observations on the international application

6 CLARITY (Art.6 PCT)

- 6.1 Claims 14 and 17 does not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not defined. The claims attempt to define the subject-matter in terms of the result to be achieved ie: selection of the antigens from a group of antigens that "provide immunity against the group of diseases selected from...", claim 14. Claim 17 "...for raising of an antigen specific CD8 response"
- 6.2 The terms "agonist" used in claim 5 and "a non-live vector" and "immunologically functional derivative thereof" in claim 15 are vague and indefinite and as such render the scope of the claims unclear; accordingly, the claim requires amendment to remove this defect (Article 6 PCT).
- 6.3 In addition claim 15 is so broadly formulated as to encompass any "a non-live vector derived from a bacterial toxin" in combination with any antigen and any adjuvant. The description however is limited to particular examples. The subject-matter of claim 15 is therefore considered not to be supported by technical details across the whole of the scope of the claim, contrary to the requirements of Article 6 PCT.

**COMPOSICIÓN DE VACUNA QUE COMPRENDE SUBUNIDAD B
DE TERMO TOXINA E. COLI Y UN ANTÍGENO Y UN ADYUVANTE**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende la subunidad B de toxina termo-lábil de *E. coli* o un derivado de la misma con homología igual o mayor de 90% complejada con un antígeno y un adyuvante.

COMPOSICIÓN DE VACUNA QUE COMPRENDE SUBUNIDAD B DE TERMO TOXINA E. COLI Y UN ANTÍGENO Y UN ADYUVANTE

Descripción de la Invención

5 La presente invención proporciona composiciones de vacuna mejoradas, métodos para hacerlas y su uso en medicina. En particular la presente invención proporciona composiciones de vacuna tratadas con adyuvante que comprenden un agente que puede mejorar la presentación de MHC clase I de un antígeno, y
10 un antígeno formulado con un adyuvante.

 El desarrollo de vacunas que requieren una inducción predominante de una respuesta celular sigue siendo un desafío. Debido a que las células T CD8+, las células ejecutoras principales de la inmunorespuesta celular, reconocen antígenos
15 que se sintetizan en células infectadas por patógenos, la vacunación acertada requiere la síntesis de antígenos inmunogénéticos en células del vacunado. Esto puede llevarse a cabo con vacunas vivo-atenuadas, no obstante también presenta limitaciones significativas. En primer lugar, existe un riesgo de
20 infección, cuando las vacunas son inmunosuprimidas, o cuando el patógeno por sí mismo puede inducir la inmunosupresión (por ejemplo Virus de la Inmunodeficiencia Humana). En segundo lugar, algunos patógenos son difíciles o imposibles de crecer en cultivos celulares (por ejemplo el Virus de Hepatitis C). Otras
25 vacunas existentes tal como vacunas de células enteras

inactivadas o con adyuvante de aluminio, las vacunas de subunidades de proteína recombinante son inductores notablemente pobres de las respuestas de CD8.

Por estas razones, se están desarrollando enfoques
5 alternativos: vacunas vivas vectorizadas, vacunas de ADN del plásmido, péptidos sintéticos o adyuvantes específicos. Las vacunas vivas vectorizadas son buenas para inducir una respuesta celular fuerte pero preexistente (por ejemplo adenovirus) o la inmunidad inducida por la vacuna contra el
10 vector puede arriesgar la eficacia de la dosis de vacuna adicional (Casimiro y colaboradores, JOURNAL OF VIROLOGY, junio 2003, p. 6305-6313). Las vacunas de ADN del plásmido también pueden inducir una respuesta celular (Casimiro y colaboradores, JOURNAL OF VIROLOGY, junio 2003, p. 6305-6313) pero sigue
15 siendo débil en humanos (Mc Conkey y colaboradores, Nature Medicine 9, 729-735, 2003) y la respuesta anticuerpo es muy pobre. Además, los péptidos sintéticos se están evaluando actualmente en experimentos clínicos (Khong y colaboradores, J Immunother 2004;27:472-477), pero la eficacia de tales vacunas
20 que codifican un número limitado de epítomos de células T puede obstaculizarse por la aparición de mutantes de escape de la vacuna o por la necesidad primero seleccionar pacientes acoplados a HLA.

Los enfoques alternativos dirigidos a mejorar la
25 presentación de la MHC clase I también se han descrito, basados

67

en la liberación del antígeno usando vectores no-vivos. Algunos
vectores no vivos se derivan de toxinas bacterianas, por ejemplo
toxina LF_n de Antrax (Ballard y colaboradores (1996) PNAS USA
93 pp 12531-12534), toxina adenilato ciclasa de B. pertussis
5 (Fayolle y colaboradores (1996) J. Immunology 156 p 4697-4706),
Exotoxina A de Pseudomonas (Donnelly y colaboradores PNAS
USA (1993) 90 pp 3530-3534), o toxina termo-lábil E. coli
(Partidos y colaboradores. Immunology (1996) 89 pp 483-487).

Las limitaciones de antígenos de vacuna y sistemas de
10 liberación justifican la búsqueda para nuevas composiciones de
vacuna. Los presentes inventores han encontrado que la
inclusión de adyuvantes en composiciones que comprenden
vectores no-vivos derivados de toxinas bacterianas puede tener
un efecto benéfico en la inmunorespuesta resultante, en particular
15 respuestas específicas de CD8. Se piensa que este efecto
benéfico es debido a la combinación de la activación de la
inmunorespuesta dada por el adyuvante con la liberación correcta
de un antígeno proporcionado por el agente que marca la
trayectoria de MHC1 en lugar de un efecto adyuvante adicional
20 proporcionado por tal agente. Los estudios anteriores que
utilizan composiciones de vacuna que contienen la subunidad B
de LT y un antígeno administrado con un adyuvante no mostraron
efecto sinérgico a la fuerza de la inmunorespuesta (McCluskie y
colaboradores 2000 Mol Medicine 6 pp 867-877; McCluskie y
25 colaboradores (2001) Vaccine 19 pp 3759- 3768).

Por lo tanto la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende la subunidad B de la toxina termo-lábil de E. coli o un derivado de la misma con homología igual o mayor de 90% complejada con un antígeno y
5 adicionalmente comprende un adyuvante.

En una modalidad adicional la subunidad B de la toxina termo-lábil de E. coli o un derivado con homología igual o mayor de 90% puede ligar el receptor G_{M1} . En una modalidad adicional la subunidad B de la toxina termo-lábil de E. coli o un derivado
10 con homología igual o mayor de 90% puede marcar un antígeno en la trayectoria de MHC clase I medida por los métodos descritos en la sección 2.1.

El término "composición de vacuna" usado en la presente se define como la composición usada para obtener una
15 inmunorespuesta contra un antígeno dentro de la composición para proteger o tratar un organismo contra enfermedad.

En el contexto de la invención, la palabra "toxina" significa toxinas que se han desintoxicado tal que no son ya tóxicas a humanos, o una subunidad de toxina o fragmento de la misma que
20 sea sustancialmente desprovista de actividad tóxica en humanos.

El vector no vivo preferido basado en toxinas desintoxicadas es la subunidad B de la toxina lábil de E. coli (LT). En la modalidad preferida, el vector no-vivo es la subunidad de B de la toxina lábil de E. coli tipo I (LTI).

25 Los vectores no vivos adicionales basados en toxinas

desintoxicadas incluyen el dominio terminal amino del factor mortal ántrax (LF), exotoxina A de *P. aeruginosa*, y la adenilato ciclase A de *B. pertussis*. Por ejemplo, el vector no-vivo se deriva de una toxina que es una familia de la familia AB5, por ejemplo, la toxina del cólera (CT), la toxina de *Bordetella Pertussis* (PT) así como citotoxinas de subtilasa recientemente identificadas. (Paton et al, J Exp Med 2004, Vol 200 pp 35-46).

La toxina lábil (LT) de *E. coli* consiste de dos subunidades, una subunidad B pentamérica y una subunidad A monomérica. La subunidad A es responsable de la toxicidad, mientras que la subunidad B es responsable del transporte en la célula. La LT une el receptor gangliosida G_{M1} .

Un derivado de toxina termo-lábil de *E. coli* con homología igual o mayor de 90% tiene mayor homología de 90% en el nivel del aminoácido. En otra modalidad la proteína tiene homología igual o mayor de 95%, por ejemplo 96, 97, 98 o 99%. Por ejemplo, las eliminaciones de aminoácido pueden hacerse que no afecten la función. En una modalidad adicional, un derivado todavía puede unir el receptor gangliosida G_{M1} . En una modalidad adicional un derivado todavía puede producir una inmunorespuesta contra un antígeno complejo medido por los métodos descritos en la sección 2.1. Se puede determinar si un vector o equivalente une el receptor G_{M1} , por ejemplo, siguiendo el protocolo indicado en el ejemplo 1.4 más adelante.

El dominio amino-terminal de LF de *B. Anthracis* (ántrax) se

conoce como LFn. Esto es 255 aminoácidos N-terminal de LF. Se ha encontrado que LF contiene la información necesaria para la unión al antígeno protector (PA) y mediación de translocación. El dominio solo carece de potencial mortal, que depende de la
 5 porción carboxilo-terminal de manera putativa enzimática (Arora and Leppla (1993) J. Biol Chem 268 pp 3334-3341). Además, se encontró recientemente que una proteína de fusión del dominio de LFn con un antígeno extranjero puede inducir las
 10 inmunorespuestas de la célula T CD8 incluso en ausencia de PA (Kushner y colaboradores (2003), PNAS 100 pp 6652-6657) sugiriendo que LFn puede utilizarse sin PA como portador para liberar antígenos en el citosol.

Donnelly y colaboradores (supra) demuestran que el dominio tóxico puede eliminarse de *P. aeruginosa* y el resto de la toxina
 15 pueden aún mediar el transporte de un antígeno en la célula. Además, la eliminación de aa de la toxina de longitud completa no deteriora su capacidad para tener acceso al citosol pero la hace no tóxica puesto que esta mutación elimina la actividad de ADP-
 20 ribosilación. Con base en este mutante, pueden construirse quimeras que codifiquen las secuencias antigénicas de varios tamaños (Fitzgerald, J Biol Chem, Vol. 273, Issue 16, 9951-9958, 17 de abril de 1998).

La toxina adenilato ciclasa une el receptor CD11b en la superficie de las células dendríticas. Los toxoides recombinantes
 25 que llevan epítomos de células T CD8⁺ pueden inducir las

respuestas de CTL específicas en ratones y se ha demostrado la protección contra tumores experimentales (Fayolle y colaboradores, J Immunol 1999, 162 pp 4157-4162). La presentación superficial de los epítomos liberados ocurre vía la

5 trayectoria de MHC clase I clásica.

Otros vectores pueden derivarse usando un receptor o imitador de receptor que se conoce que se une a una toxina bacteriana para la selección de una biblioteca de despliegue del fago. Tal técnica proporcionará los péptidos (por ejemplo hasta

10 20 aminoácidos o así en longitud) que podrían unirse al mismo receptor que la toxina bacteriana, pero tendría poca o ninguna similitud de secuencia a la toxina. Esta técnica ha mostrado ser una manera efectiva de generar péptidos que se unen al receptor GB3 (Miura y colaboradores Biochimica et Biophysica Acta 1673

15 (2004) pp 131 - 138) y el receptor GM1 (Matsubara y colaboradores FEBS letters 456 (1999) 253-256). Es probable que tales péptidos puedan actuar como vectores en la misma manera como las toxinas bacterianas que unen a los mismos receptores. Se considera que tales péptidos caen dentro de la

20 definición "vector derivado de una toxina bacteriana" puesto que se derivan seleccionando en el mismo receptor que el que se une la toxina bacteriana. En una modalidad, sin embargo, el vector de la invención que es "derivado de una toxina bacteriana" es realmente una toxina bacteriana o un equivalente

25 inmunológicamente funcional de la misma.

No se incluyen dentro del alcance de la presente invención los vectores no vivos o equivalentes inmunológicamente funcionales de los mismos que pueden unirse al receptor Gb3. Si un vector o equivalente unido al receptor Gb3 puede determinarse, por ejemplo, siguiendo el protocolo indicado en la sección 1.5 más adelante.

Las composiciones de la invención son capaces de mejorar una inmunorespuesta específica de CD8 al antígeno complejo a una proteína de la invención. La mejora es medida observando la respuesta a una composición de la invención que comprende un antígeno complejo a una proteína de la invención y que comprende un adyuvante cuando se compara con la respuesta a una composición que comprende un antígeno complejo a una proteína de la invención sin adyuvante, o la respuesta a una formulación que comprende el antígeno con adyuvante. La mejora puede definirse como un aumento en el nivel de la inmunorespuesta, la generación de una inmunorespuesta equivalente con una dosis inferior de antígeno, un aumento en la calidad de la inmunorespuesta, un aumento en la persistencia de la inmunorespuesta, o cualquier combinación de lo anterior. Tal mejora puede verse después de una primera inmunización, y/o puede verse después de inmunizaciones subsecuentes.

Los adyuvantes particulares son los seleccionados del grupo de sales metálicas, emulsiones aceite en agua, ligandos de receptores tipo Toll, (en particular ligando del receptor 2 tipo Toll,

ligando del receptor 3 tipo Toll, ligando del receptor 4 tipo Toll, ligando del receptor 7 tipo Toll, ligando del receptor 8 tipo Toll y ligando del receptor 9 tipo Toll), saponinas o combinaciones de las mismas. En una modalidad, el ligando del receptor tipo Toll es un agonista del receptor. En otra modalidad, el ligando del receptor tipo Toll es un antagonista del receptor. El término "ligando" como se utiliza a través de la descripción y las reivindicaciones significa una entidad que pueda unir al receptor y tener un efecto, ya sea regular ascendentemente o regular descendentemente la actividad del receptor.

El adyuvante se selecciona preferiblemente del grupo: saponina, lípido A o un derivado del mismo, oligonucleótido inmunoestimulante, fosfato de alquilo glucosaminida, o combinaciones de los mismos. Un adyuvante preferido adicional es una sal metálica en combinación con otro adyuvante. Se prefiere que el adyuvante sea un ligando del receptor tipo Toll en particular un ligando de un receptor 2, tipo Toll 3, 4, 7, 8 ó 9, o una saponina, en particular Qs21. Se prefiere adicionalmente que el sistema adyuvante comprenda dos o más adyuvantes de la lista anterior. En particular las combinaciones preferiblemente contienen un adyuvante de saponina (en particular Qs21) y/o un ligando del receptor 9 tipo Toll tal como un oligonucleótido inmunoestimulante que contiene CpG u otros motivos inmunoestimulantes tales como CpR donde R es un nucleótido de guanosina no-natural. Otras combinaciones preferidas

comprenden una saponina (en particular Qs21) y un ligando del receptor 4 tipo Toll tal como el lípido A monofosforil o su derivado desacilado 3, 3 D - MPL, o una saponina (en particular Qs21) y un ligando del receptor 4 tipo Toll tal como un fosfato de alquilo glucosaminida. Otras combinaciones preferidas comprenden un
5 ligando 3 ó 4 de TLR en combinación con un ligando 8 ó 9 de TLR.

Los adyuvantes particularmente preferidos son combinaciones de 3D-MPL y QS21 (documento EP 0 671 948 B1),
10 emulsiones aceite en agua que comprenden 3D-MPL y QS21 (documentos WO 95/17210, WO 98/56414), o 3D-MPL formulado con otros portadores (documento EP 0 689 454 B1). Otros sistemas adyuvantes preferidos comprenden una combinación de 3 D MPL, QS21 y un oligonucleótido de CpG como se describe en
15 los documentos US6558670, US6544518.

En una modalidad el adyuvante es un ligando del receptor 4 tipo Toll (TLR), preferiblemente un ligando tal como un lípido A derivado particularmente del monofosforil-lípido A o más particularmente el monofosforil-lípido A3 desacilado (3 D - MPL).

20 3D-MPL es vendido bajo la marca registrada MPL® por GSK biologicals y promueve principalmente las respuestas de células T CD4+ con un fenotipo de IFN-g (Th1). Puede producirse de acuerdo a los métodos descritos en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla del monofosforil-lípido A 3-
25 desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Preferiblemente en

las composiciones de la presente invención, se utiliza la partícula pequeña de 3D-MPL. La partícula pequeña de 3D-MPL tiene un tamaño de partícula tal que puede ser estéril-filtrado a través de un filtro de 0.222 μm . Tales preparaciones se describen en la
 5 Solicitud de Patente Internacional No. WO 94/21292. Los derivados sintéticos del lípido A se conocen y se cree que son ligandos de TLR incluyendo, pero sin limitarse a:

OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetra-
 10 dodecanoilamino]-4-o-fosfono- β -D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]- α -D-glucopiranosildihidrogenofosfato),
 (WO 95/14026)

OM 294 DP (3S,9R)-3--[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-bis
 15 (dihidrogenofosfato) (WO 99/64301 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-(6-aminohexanoato) (WO 01/46127).

20 Otros ligandos de TLR4 que pueden utilizarse son los fosfatos de alquilo glucosaminida (AGPs) por ejemplo como los descritos en el documento WO9850399 o US6303347 (también se describen procesos para la preparación de AGPs), o sales farmacéuticamente aceptables de AGPs como se describe en el
 25 documento US6764840. Algunos AGPs son agonistas de TLR4, y

algunos son antagonistas de TLR4. Se cree que ambos son útiles como adyuvantes.

Otro inmunoestimulante preferido para el uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol suramericano *Quilaja Saponaria Molina* y fue primero descrito por tener actividad adyuvante por Dalsgaard y colaboradores en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlín, p 243-254). Se han aislado fragmentos purificados de Quil A con CLAR que conservan la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de la *Quillaja saponaria Molina* que induce células T citotóxicas de CD8+ (CTLs), células Th1 y una respuesta anticuerpo IgG2a predominante y es una saponina preferida en el contexto de la presente invención.

Se ha descrito que las formulaciones particulares de QS21 son particularmente preferidas, estas formulaciones además comprenden un esteroide (documento WO96/33739). Las saponinas que forman parte de la presente invención pueden separarse en la forma de micelas, micelas mezcladas (de preferencia, pero no exclusivamente con sales de bilis) o pueden estar en la forma de matrices de ISCOM (documento EP 0 109 942 B1), liposomas o estructuras coloidales relacionadas tal como complejos multiméricos tipo gusano o anillo o estructuras y laminillas

lipídicas/revestidas cuando son formuladas con colesterol y
lípidos, o en la forma de una emulsión de aceite en agua (por
ejemplo como en el documento WO 95/17210). Las saponinas
pueden preferiblemente asociarse con una sal metálica, tal como
5 hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (documento WO
98/15287). Preferiblemente, la saponina se presenta en la forma
de una liposoma, ISCOM o una emulsión de aceite en agua.

También pueden utilizarse oligonucleótidos
inmunoestimulantes o cualquier otro ligando del receptor 9 (TLR)
10 tipo Toll. Los oligonucleótidos preferidos para uso en adyuvantes
o vacunas de la presente invención son oligonucleótidos que
contienen CpG, preferiblemente que contienen dos o más motivos
dinucleótido CpG separados por al menos tres, más
preferiblemente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG
15 es un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de
guanina. Los oligonucleótidos CpG de la presente invención son
normalmente desoxinucleótidos. En una modalidad preferida el
internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más
preferiblemente un enlace de fosforotioato, aunque el fosfodiéster
20 y otros enlaces internucleótido están dentro del alcance de la
invención. También se incluyen dentro del alcance de la
invención oligonucleótidos con enlaces de internucleótido
mezclados. Los métodos para producir oligonucleótidos de
fosforotioato o fosforoditioato se describen en los documentos
25 US5,666,153, US5,278,302 y WO95/26204.

Los ejemplos de oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes secuencias. Las secuencias preferiblemente contienen enlaces modificados fosforotioato de internucleótido.

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

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

OLIGO 3 (SEC ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4 (SEC ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEC ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

OLIGO 6 (SEC ID NO:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)

10 Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias preferidas anteriores en que tienen eliminaciones o adiciones inconsecuentes a los mismos.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes alternativos pueden comprender modificaciones a los nucleótidos. Por ejemplo, los documentos WO0226757 y WO03507822 describen modificaciones a la porción C y G de un CpG que contiene oligonucleótidos inmunoestimulantes.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes utilizados en la presente invención pueden sintetizarse por cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo ver el documento EP 468520). Convenientemente, tales oligonucleótidos pueden sintetizarse utilizando un sintetizador automatizado.

Los ejemplos de un ligando TLR 2 incluyen peptidoglicano o lipoproteína. Las imidazoquinolinas, tal como Imiquimod y Resiquimod son ligandos de TLR7 conocidos. El ARN

25

76

monocatenario es también un ligando de TLR conocido (TLR8 en humanos y TLR7 en ratones), mientras que el ARN bicatenario y poly IC (ácido poliinosínico-policitidílico - un mimético comercialmente sintético de ARN viral). Son ejemplares de ligandos de TLR 3. 3D-MPL es un ejemplo de un ligando de TLR4 mientras que CPG es un ejemplo de un ligando de TLR9.

El vector no-vivo derivado de una toxina bacteriana o equivalente inmunológicamente funcional del mismo y el antígeno son complejados juntos. Complejados significa que el vector no-vivo derivado de una toxina bacteriana o equivalente inmunológicamente funcional de la misma y el antígeno están físicamente asociados, por ejemplo vía una interacción electrostática o hidrofóbica o un enlace covalente. En una modalidad preferida el vector no-vivo derivado de una toxina bacteriana o equivalente inmunológicamente funcional de la misma están covalentemente ligados ya sea como una proteína de fusión o químicamente acoplados, por ejemplo vía un residuo de cisteína. En las modalidades de la invención más de un antígeno se liga a cada vector no-vivo o equivalente inmunológicamente funcional del mismo por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 moléculas del antígeno por vector. Cuando más de un antígeno está presente, estos antígenos pueden todos ser iguales, uno o más pueden ser diferentes a los otros, o todos los antígenos pueden ser diferentes entre sí.

El antígeno por sí mismo puede ser un péptido, o una

proteína que comprende uno o más epítopos de interés. Esta es una modalidad preferida donde el antígeno es seleccionado tal que cuando es formulado de la manera contemplada por la invención proporciona la inmunidad contra patógenos intracelulares tales como VIH, tuberculosis, Clamidia, HBV, HCV e influenza. La presente invención también encuentra utilidad con antígenos que pueden elevar las inmunorespuestas relevantes contra trastornos benignos y proliferativos tales como cánceres.

Preferiblemente las formulaciones de vacuna de la presente invención contienen un antígeno o composición antigénicas capaz de producir una inmunorespuesta contra un patógeno humano, donde el antígeno o composición antigénicas se deriva de VIH-1, (tal como gag o fragmentos del mismo, por ejemplo p24, tat, nef, envoltura tal como gp120 o gp160, o fragmentos de cualquiera de éstos), virus del herpes humano, tal como gD o derivados de los mismos o proteína Temprana Inmediata tal como ICP27 de HSV1 o HSV2, citomegalovirus ((esp Human)(tal como gB o derivados de los mismos), antígeno Rotaviral, virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados de los mismos), Virus Varicela Zoster (tal como gpl, II y IE63), o forma de virus de la hepatitis tal como el virus de la hepatitis B (por ejemplo el antígeno Superficial de Hepatitis B o un derivado del mismo), o antígenos del virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C y virus de la hepatitis E, o de otros patógenos virales, tal como paramixovirus: Virus Sincitial

Respiratorio (tal como proteínas F, G y N o derivados de los mismas), virus de parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo HPV 6, 11, 16, 18) flavivirus (por ejemplo Virus de la Fiebre Amarilla, Virus del Dengue, Virus de la Encefalitis transmitida por garrapatas, Virus de la Encefalitis Japonesa) o virus de la influenza purificado o proteínas recombinantes de los mismos, tal como proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas), o derivado de patógenos bacterianos tal como *Neisseria spp*, incluyendo *N. gonorrhea* y *N. meningitidis* (por ejemplo, proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. piogenes* (por ejemplo proteínas M o fragmentos de las mismas, proteasa C5A), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo adhesinas e invasinas de peso molecular alto y bajo); *Bordetella spp*, incluyendo *B. pertussis*. (por ejemplo pertactina, toxina pertussis o derivados de los mismos, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbria), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo 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, toxinas termo lábiles o derivados de las mismas, toxina termoestables o derivados de las mismas), *E. coli*

enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena *Vibrio* spp, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera o derivados de la misma); *Shigella* spp, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia* spp, incluyendo *Y. enterocolitica* (por
 5 ejemplo una proteína Yop), *V. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campilobacter* spp, 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.*
 10 *pilori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina de vacuolación); *Pseudomonas* spp, incluyendo *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 tétanos y derivados de la
 15 misma), *C. botulinum* (por ejemplo toxina de botulino y derivados de la misma), *C. difficile* (por ejemplo toxinas de Clostridium A o B y derivados de las mismas); *Bacillus* spp., incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina de botulino y derivados de la misma); *Corynebacterium* spp., incluyendo *C. diphtheriae* (por
 20 ejemplo toxina de la difteria y derivados de la misma); *Borrelia* spp., incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia* spp.,
 25 incluyendo *E. equi* y el agente de la Erliquiosis Granulocítica

Humana; *Rickettsia* spp, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia* spp.,
 incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión
 a heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de
 unión a heparina), *C. psittaci*; *Leptospira* spp., incluyendo *L.*
 5 *interrogans*; *Treponema* spp., incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo
 las proteínas de membrana externa rara), *T. denticola*, *T.*
hyodysenteriae; o derivado de parásitos tal como *Plasmodium*
spp., incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma* spp., incluyendo *T.*
gondii (por ejemplo SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba* spp.,
 10 incluyendo *E. histolytica*; *Babesia* spp., incluyendo *B. microti*;
Trypanosoma spp., incluyendo *T. cruzi*; *Giardia* spp., incluyendo
G. lamblia; *Leshmania* spp., incluyendo *L. major*; *Pneumocystis*
spp., incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas* spp., incluyendo *T.*
vaginalis; *Schistosoma* spp., incluyendo *S. mansoni*, o derivado
 15 de levadura tal como *Candida* spp., incluyendo *C. albicans*;
Cryptococcus spp., incluyendo *C. neoformans*.

Otros antígenos específicos preferidos para la *M.*
tuberculosis son por ejemplo Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1,
 Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (documento WO
 20 99/51748). Las proteínas para la *M. tuberculosis* también
 incluyen proteínas de fusión y variantes de las mismas donde por
 lo menos dos, preferiblemente tres polipéptidos de *M.*
tuberculosis están fusionados en una proteína mayor. Las
 fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI,
 25 DPV-MTI- MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTTC2, Erd14-DPV-MTI-

MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99/51748).

Los antígenos más preferidos para *Clamidia* incluyen por ejemplo la Proteína de Peso Molecular Alto (HMW) (documento WO 99/17741), ORF3 (documento EP 366 412), y proteínas de
5 membrana putativa (Pmps). Otros antígenos de *Clamidia* de la formulación de vacuna pueden seleccionarse del grupo descrito en el documento WO 99/28475.

Las vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos
10 derivados de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (por ejemplo, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina) y la Pneumolisina del antígeno de proteína (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins y colaboradores., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342), y el mutante desintoxicado derivado
15 de los mismos (documentos WO 90/06951; WO 99/03884). Otras vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B, *H. influenzae no clasificable*, por ejemplo OMP26, adhesinas de peso molecular alto, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbrina y
20 péptidos derivados de fimbrina (documento US 5,843,464) o variantes de copia múltiples o proteínas de fusión de los mismos.

Los derivados del antígeno superficial de la hepatitis B son bien conocidos en la técnica e incluyen, inter alia, los antígenos PreS1, PreS2 S indicados descritos en las solicitudes de Patente
25 Europea EP-A-414 374; EP-A-0304 578 y EP 198-474. En un

aspecto preferido la formulación de vacuna de la invención comprende el antígeno VIH-1, gp120, especialmente cuando está expresado en las células CHO. En una modalidad adicional, la formulación de vacuna de la invención comprende gD2t como se definió anteriormente.

En una modalidad preferida de la presente invención, las composiciones de vacuna comprenden el antígeno derivado del Virus del Papiloma Humano (HPV) considerado ser responsable de las verrugas genitales (HPV 6 o HPV 11 y otros), y los virus de HPV responsables del cáncer cervical (HPV16, HPV18 y otros).

Las formas particularmente preferidas de vacuna profiláctica o terapéutica contra verruga genital, comprenden proteína L1 y proteínas de fusión que comprenden uno o más antígenos seleccionados de las proteínas de HPV E1, E2, E5, E6, E7, L1 y L2.

Las formas más preferidas de proteína de fusión son: L2E7 como se describe en el documento WO 96/26277, y la proteína D(1/3)-E7 descrita en el documento WO99/10375.

Una vacuna de profilaxis o terapéutica preferida contra infección cervical de HPV o cáncer puede comprender los antígenos HPV 16 ó 18.

Los antígenos HPV 16 particularmente preferidos comprenden las proteínas tempranas E6 o E7 en fusión con un portador de proteína D para formar fusiones de Proteína D - E6 o E7 de HPV 16, o combinaciones de las mismas; o combinaciones

de E6 o E7 con L2 (documento WO 96/26277).

Alternativamente las proteínas tempranas 16 ó 18 de HPV E6 y E7, pueden presentarse en una sola molécula, preferiblemente una fusión de Proteína D - E6/E7. Tal vacuna
5 opcionalmente puede contener cualquier o ambas proteínas E6 y E7 de HPV 18, preferiblemente en la forma de una proteína de fusión de proteína D - E6 o proteína D - E7, o Proteína de fusión de proteína D E6/E7.

La vacuna de la presente invención puede comprender
10 adicionalmente antígenos de otras cepas de HPV, preferiblemente de cepas HPV 31 ó 33.

Las composiciones de vacuna de la presente invención adicionalmente comprenden antígenos derivados de parásitos que causan la Malaria, por ejemplo, antígenos de *Plasmodia*
15 *falciparum* incluyendo la proteína de circumsporozoita (proteína de CS), RTS,S, MSP1, MSP3, LSA1, LSA3, AMA1 y TRAP. RTS es una proteína híbrida que comprende sustancialmente toda la porción C-terminal de la proteína de circumsporozoita (CS) de *P. falciparum* ligada vía cuatro aminoácidos de la porción preS2 del
20 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 No. PCT/EP92/02591, publicada bajo la prioridad reivindicada Número WO 93/10152 de la solicitud de patente Británica No. 9124390.7. Cuando se
25 expresa en RTS de levadura se produce como una partícula de

lipoproteína, y cuando se co-expresa con el antígeno S de HBV se produce una partícula mezclada conocida como RTS,S. Los antígenos TRAP se describen en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/GB89/00895, publicada bajo el documento

5 WO 90/01496. Los antígenos de *Plasmodia* que son candidatos probables a ser componentes de una vacuna de Malaria de etapas múltiples son *P. falciparum* MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXPI, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230

10 y sus análogos en *Plasmodium* spp. Una modalidad de la presente invención es una vacuna contra la malaria en donde la preparación del antígeno comprende la proteína RTS,S o CS o un fragmento de la misma tal como la porción CS de RTS,S, en combinación con uno o más antígenos de la malaria adicionales,

15 cualquiera o ambos pueden unirse a la subunidad B de toxina Shiga de acuerdo con la invención. Uno o más antígenos de la malaria adicionales pueden seleccionarse por ejemplo del grupo que consiste de MPS1, MSP3, AMA1, LSA1 o LSA3.

Las formulaciones pueden también contener un antígeno

20 antitumoral y ser útiles para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Por ejemplo, la formulación adyuvante encuentra utilidad con antígenos de rechazo del tumor tal como para los cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmón, pancreático, renal o melanoma. Los antígenos ejemplares incluyen MAGE 1 y

25 de MAGE 3 u otros antígenos MAGE (para el tratamiento del

melanoma), PRAME, BAGE, o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pps 628-636; Van den Eynde y colaboradores, International Journal of Clinical & Laboratory Research (presentada en 1997); Correale y colaboradores. 5 (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p 293. Actualmente estos antígenos se expresan en un intervalo amplio de tipos de tumores tal como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma de vejiga. Otros antígenos de tumor específico son adecuados para uso con los adyuvantes de la 10 presente invención e incluyen, pero no se restringen a gangliosidas específicos de tumor, antígeno específico de próstata (PSA) o Her-2/neu, KSA (GA733), PAP, mamaglobina, MUC-1, antígeno carcinoembrionario (CEA) o p501S (prosteína). Por consiguiente en un aspecto de la presente invención se 15 proporciona una vacuna que comprende una composición adyuvante de acuerdo a la invención y un antígeno de rechazo del tumor.

Es un aspecto particularmente preferido de la presente invención, que las vacunas comprendan un antígeno tumoral tal 20 como cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmón, pancreático, renal, ovárico o melanoma. Por consiguiente, las formulaciones pueden contener el antígeno asociado al tumor, así como antígenos asociados con mecanismos de soporte al tumor (por ejemplo angiogénesis, invasión tumoral). Adicionalmente, 25 los antígenos particularmente relevantes para las vacunas en la

terapia del cáncer también comprenden el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), Antígeno de Células Madre de la Próstata (PSCA), tirosinasa, survivina, NY-ESO1, prostasa, PS108 (documento WO 98/50567), p501S (prosteína), RAGE, LAGE, HAGE. Adicionalmente el antígeno puede ser una hormona peptídica por sí misma tal como la hormona que libera hormona Gonadotrofina de longitud completa (GnRH, documento WO 95/20600), un péptido largo de 10 aminoácidos corto, útil en el tratamiento de muchos cánceres, o en la inmunocastración.

10 Las vacunas de la presente invención pueden utilizarse para la profilaxis o terapia de la alergia. Tales vacunas comprenderán antígenos específicos de alérgenos, por ejemplo Der p1.

La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induzca una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos, en vacunados normales. Tal cantidad variará dependiendo de cual inmunógeno específico se utilice y cómo se presente.

Generalmente, se espera que cada dosis humana comprenda 0.1-1000 μg de antígeno, preferiblemente 0.1-500 μg , preferiblemente 0.1-100 μg , más preferiblemente 0.1 a 50 μg . Una cantidad óptima para una vacuna particular puede determinarse por estudios estándares que involucren la observación de inmunorespuestas apropiadas en sujetos vacunados. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones reforzadas

adecuadamente espaciadas. Tal formulación de vacuna puede aplicarse a una superficie mucosa de un mamífero en un régimen de vacunación de cebado o refuerzo; o alternativamente administrarse sistémicamente, por ejemplo *vía* las rutas
5 transdérmica, subcutánea o intramuscular. Se prefiere la administración intramuscular.

La cantidad de 3 D MPL usada es generalmente pequeña, pero dependiendo de la formulación de vacuna puede estar en la región de 1-1000 μg por dosis, preferiblemente 1-500 μg por
10 dosis, y más preferiblemente entre 1 a 100 μg por dosis.

La cantidad de CpG u oligonucleótidos inmunoestimulantes en los adyuvantes o vacunas de la presente invención es generalmente pequeña, pero dependiendo de la formulación de vacuna puede estar en la región de 1-1000 μg por dosis,
15 preferiblemente 1-500 μg por dosis, y más preferiblemente entre 1 a 100 μg por dosis.

La cantidad de saponina para uso en las composiciones de la presente invención puede estar en la región de 1-1000 μg por dosis, preferiblemente 1-500 μg por dosis, más preferiblemente 1-
20 250 μg por dosis, y más preferiblemente entre 1 a 100 μg por dosis.

Las formulaciones de la presente invención pueden usarse para los propósitos profilácticos y terapéuticos. Por consiguiente la invención proporciona una composición de vacuna como se
25 describe en la presente para uso en medicina.

En una modalidad adicional se proporciona un método de tratamiento de un individuo susceptible a o que sufre de una enfermedad mediante la administración de una composición como se describe sustancialmente en la presente.

5 También se proporciona un método para evitar que un individuo contraiga una enfermedad seleccionada del grupo que comprende enfermedades infecciosas, bacterianas y virales, enfermedades parásitas, particularmente enfermedad patógena intracelular, enfermedades proliferativas tales como cánceres de
10 próstata, mama, colorrectal, pulmón, pancreático, renal, ovárico o melanoma; trastornos crónicos no-cancerosos, alergia que comprende la administración de una composición como se describe sustancialmente en la presente al individuo.

Además, se describe un método para inducir la
15 inmunorespuesta específica del antígeno CD8+ en un mamífero, que comprende administrar al 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 un vector no-vivo o equivalente funcional
20 inmunológico del mismo con un adyuvante.

Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para uso en las combinaciones de la presente invención incluyen, entre otros, agua, solución salina amortiguada con fosfato, soluciones amortiguadoras isotónicas.

25 La presente invención es ejemplificada por la referencia a

los siguientes ejemplos y figuras. En todas las figuras, el adeno-
 ova (vector de adenovirus que contiene proteína OVA) se utilizó
 como un control positivo en la primera inyección. P/B
 (cebador/refuerzo) es un control positivo con la primera inyección
 5 de Adeno-Ova, y en segundo lugar, la inyección de refuerzo de
 Ova en AS A.

**Las siguientes figuras muestran el efecto del Sistema
 Adyuvante A en la inmunorespuesta a LT-ova y LTcys-Ova**

Figura 1: respuesta de CD8 - tetrámero 6 días post 1 -
 10 frecuencia de CD8 específica de Siinfekl (% dentro de CD8+)

Figura 2: respuesta de CD8- tetrámero 14 días post 1 -
 frecuencia de CD8 específica de Siinfekl (% dentro de CD8+)

Figura 3: respuesta de CD8- tetrámero 6 días post 2 -
 frecuencia de CD8 específica de Siinfekl (% dentro de CD8+)

Figura 4: respuesta de CD8- tetrámero 60 días post 2 -
 15 frecuencia de CD8 específica de Siinfekl
 (% dentro de CD8+)

Figura 5: respuesta de CD8- tetrámero 88 días post 2 -
 frecuencia de CD8 específica de Siinfekl (% dentro de CD8+)

Figura 6: respuesta de CD8 - ICS: 14 días post 1 -
 20 frecuencia de CD8 que produce citocina específica de ova (%
 dentro de CD8+)

Figura 7: respuesta de CD8 - ICS: 6 días post 2 - frecuencia
 de CD8 que produce citocina específica de ova (% dentro de
 25 CD8+)

Figura 8: respuesta de CD8 - ICS: 60 días post 2 - frecuencia de CD8 que produce citocina específica de ova (% dentro de CD8+)

5 Figura 9: respuesta de CD8 - ICS: 88 días post 2 - frecuencia de CD8 que produce citocina específica de ova (% dentro de CD8+)

Figura 10: CD4 respuesta - ICS: 14 días post 1 - frecuencia de CD4 que produce citocina específica de ova (% dentro de CD4+)

10 Figura 11: CD4 respuesta - ICS: 6 días post 2 - frecuencia de CD4 que produce citocina específica de ova (% dentro de CD4+)

15 Figura 12: CD4 respuesta - ICS: 60 días post 2 - frecuencia de CD4 que produce citocina específica de ova (% dentro de CD4+)

Figura 13: CD4 respuesta - ICS: 88 días post 2 - frecuencia de CD4 que produce citocina específica de ova (% dentro de CD4+)

20 Figura 14: respuesta de CD8 - actividad citotóxica detectada *in vivo* 18H después de la inyección objetivo: 12 días post 2 - lisis específica Siinfekl (%)

Figura 15: Respuesta humoral - ELISA - suero reforzado: título de anticuerpo específico anti-ova (14 post 2)

25 Figura 16: Respuesta humoral - ELISA - suero reforzado: título de anticuerpo específico anti-LTcys (14 post 2)

Figura 17: Respuesta humoral - ELISA - suero individual:
título de anticuerpo específico anti-ova (14 post 2)

Figura 18: Respuesta humoral - ELISA - suero individual:
título de anticuerpo específico anti-LTcys (14 post 2)

5 **Las siguientes figuras muestran el efecto del Sistema
Adyuvante A en la inmunorespuesta a LT-ova y LTcys-Ova
purificado.**

Figura 19: respuesta de CD8 - tetrámero 6 días post 1 -
frecuencia de CD8 específica Siinfekl (% dentro de CD8+)

10 Figura 20: respuesta de CD8 - tetrámero 14 días post 1 -
frecuencia de CD8 específica Siinfekl (% dentro de CD8+)

Figura 21: respuesta de CD8 - tetrámero 6 días post 2 -
frecuencia de CD8 específica Siinfekl (% dentro de CD8+)

15 Figura 22: respuesta de CD8 - tetrámero 58 días post 2 -
frecuencia de CD8 específica Siinfekl (% dentro de CD8+)

Figura 23: respuesta de CD8 - ICS: 6 días post 1 -
frecuencia de CD8 que produce citocina específica de ova (%
dentro de CD8+)

20 Figura 24: respuesta de CD8 - ICS: 14 días post 1 -
frecuencia de CD8 que produce citocina específica de ova (%
dentro de CD8+)

Figura 25: respuesta de CD8 - ICS: 6 días post 2 -
frecuencia de CD8 que produce citocina específica de ova (%
dentro de CD8+)

25 Figura 26: respuesta de CD8 - ICS: 58 días post 2 -

frecuencia de CD8 que produce citocina específica de ova (% dentro de CD8+)

Figura 27: CD4 respuesta - ICS: 6 días post 1 - frecuencia de CD4 que produce citocina específica de ova (% dentro de CD4+)

Figura 28: CD4 respuesta - ICS: 14 días post 1 - frecuencia de CD4 que produce citocina específica de ova (% dentro de CD4+)

Figura 29: CD4 respuesta - ICS: 6 días post 2 - frecuencia de CD4 que produce citocina específica de ova (% dentro de CD4+)

Figura 30: CD4 respuesta - ICS: 58 días post 2 - frecuencia de CD4 que produce citocina específica de ova (% dentro de CD4+)

Figura 31: respuesta de CD8 - actividad citotóxica detectada *in vivo* 18H después de la inyección objetivo: 21 días post 1 - lisis específica Siinfekl (%)

Figura 32: respuesta de CD8 - actividad citotóxica detectada *in vivo* 18H después de la inyección objetivo: 65 días post 2 - lisis específica Siinfekl (%)

Figura 33: Respuesta humoral - ELISA - suero reforzado: título de anticuerpo específico anti-ova (22 post 2)

Figura 34: Respuesta humoral - ELISA - suero reforzado: título de anticuerpo específico anti-LTcys (22 post 2)

Las siguientes figuras muestran el efecto de los

Sistemas adyuvantes A, H y G en la inmunorespuesta a StxB-ova y LT-Ova.

Figura 35: respuesta cinética de CD8 - análisis de tetrámero en diferentes puntos de tiempo (7post1, 14post1, 6post2, 58post2) - frecuencia de CD8 específica Siinfekl (% dentro de CD8+)

Figura 36: respuesta cinética de CD8 - análisis de tetrámero en diferentes puntos de tiempo (7post1, 14post1, 6post2, 58post2) para un intervalo de dosis de ambos vectores (LT vs STxB) - frecuencia de CD8 específica Siinfekl (% dentro de CD8+)

Las siguientes figuras muestran el efecto del Sistema Adyuvante A en la inmunorespuesta contra el conjugado Siinfekl a los vectores alternativos.

Figura 37: Frecuencia CD 8 específica Siinfekl en PBLs 7 días después de la primera inyección con la vacuna AS A LTSiinfekl

Figura 38: Frecuencia CD 8 específica Siinfekl en PBLs 15 días después de la primera inyección con la vacuna AS A LTSiinfekl

Figura 39: Frecuencia CD 8 específica Siinfekl en PBLs 7 días después de la segunda inyección con la vacuna AS A LTSiinfekl

Figura 40: Frecuencia CD 8 específica Siinfekl en PBLs 7 días después de la primera inyección con la vacuna Exo-A-Siinfekl AS A o LF-Siinfekl AS A

Figura 41: Frecuencia CD 8 específica Siinfekl en PBLs 14 días después de la primera inyección con la vacuna Exo-A-Siinfekl AS A o LF-Siinfekl AS A

Figura 42: Frecuencia CD 8 específica Siinfekl en PBLs 7 días después de la segunda inyección con la vacuna Exo-A-Siinfekl AS A o LF-Siinfekl AS A

Ejemplo 1: Reactivos y medios

1.1 Preparación de los recombinantes LTB, LTB-cys y LTB-Siinfekl

Las secuencias que codifican LTB, LTB-cys (SEC ID No. 7) y LTB-Siinfekl (SEC ID No. 8) se amplificaron por PCR y clonaron en vectores de expresión pET para la expresión en E Coli. Un extracto de proteína total se obtuvo de un sedimento bacteriano en $OD_{(620)} 60$ usando la prensa de French. Después de centrifugación a 30' a 15000 g, el sobrenadante se cosechó y precipitó agregando $(NH_4)_2SO_4$ (4.95 g/10 ml) e incubando por al menos 4 horas a 4°C. El sedimento de proteína se cosechó después de la centrifugación, se disolvió en PBS (concentración de 4 veces), y se dializó intensivamente contra el mismo amortiguador. La fracción insoluble se eliminó mediante centrifugación y filtración 0.22 μm . El sobrenadante clarificado se cargó en una columna de XK16/15 cm de longitud que contenía 15 ml de resina D-galactosa inmovilizada pre-equilibrada en PBS (Calbiochem), y se lavó con PBS hasta que la densidad óptica cayó al nivel basal. La proteína unida se eluyó con galactosa 1 M

en PBS. Después de la diálisis, la proteína recuperada se visualizó por SDS-Page, tinción de Coomassie y electroinmunotransferencia. Este método de purificación de proteínas que usa una resina D-galactosa puede también
 5 utilizarse para determinar si una proteína de interés une el receptor GM1.

SEC ID No. 7

ATGAATAAAGTAAAATGTTATGTTTTATTTACGGCGTTACTATCCTC
 TCTATGTGCATACGGAGCTCCCCAGTCTATTACAGAACTATGTTTCG
 10 GAATATCGCAACACACAAATATATACGATAAATGACAAGATACTAT
 CATATACGGAATCGATGGCAGGCAAAAGAGAAATGGTTATCATT
 CATTTAAGAGCGGCGCAACATTTTCAGGTCTGAAGTCCCGGGCAGTC
 AACATATAGACTCCCAAAAAAAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACA
 CATTAAGAATCACATATCTGACCGAGACCAAAATTGATAAATTATG
 15 TGTATGGAATAATAAAACCCCCAATTCAATTGCGGCAATCAGTATG
 GAAAACTGCTAA

SEC ID No. 8

ATGAATAAAGTAAAATGTTATGTTTTATTTACGGCGTTACTATCCTC
 TCTATGTGCATACGGAGCTCCCCAGTCTATTACAGAACTATGTTTCG
 20 GAATATCGCAACACACAAATATATACGATAAATGACAAGATACTAT
 CATATACGGAATCGATGGCAGGCAAAAGAGAAATGGTTATCATT
 CATTTAAGAGCGGCGCAACATTTTCAGGTCTGAAGTCCCGGGCAGTC
 AACATATAGACTCCCAAAAAAAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACA
 CATTAAGAATCACATATCTGACCGAGACCAAAATTGATAAATTATG
 25 TGTATGGAATAATAAAACCCCCAATTCAATTGCGGCAATCAGTATG

GAAAACAGCCAGCTTGAGAGTATAATCAACTTTGAAAAACTGACTG
AATGGCGCGGCCGCTAG

El vector LTB y LTB-cys (SEC ID No. 7) se conjugó al
antígeno de Ovalbúmina de pollo de longitud completa disponible
5 comercialmente como se describe en las siguientes secciones y
se formuló en ASA, ASH o ASG.

El recombinante ITB-Siinfekl (SEC ID No. 8) se formuló
directamente en el sistema adyuvante A indicado más adelante.

Preparación del conjugado LTB/OVA

10 El antígeno de Ovalbúmina de pollo de longitud completa
disponible comercialmente (5 mg) se redujo exponiendo los
grupos SH mediante el tratamiento de DTT durante 2 horas a
temperatura ambiente. DTT se eliminó usando una columna PD10
(Sephadex G-25, Amersham) (elución con amortiguador de fosfato
15 2 mM pH 6.8, fracciones de 1 ml). El vector LTB descrito antes (8
mg) se activó usando un exceso molar diez veces de SGMBS
durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de SGMBS se
eliminó usando una columna PD10 (elución con amortiguador de
fosfato 100 mM pH 7.2, fracciones de 1 ml). Para la conjugación,
20 las cantidades equimolares de Ovalbúmina reducida (OVA-SH) y
LTB activado se hicieron reaccionar durante 1 hora a temperatura
ambiente. El conjugado resultante se purificó mediante filtración
molecular en una columna Sephacryl S-300 HR (elución con
amortiguador de fosfato 100 mM pH 6.8, fracciones de 1 ml).

25 El conjugado de LTB/OVA entonces se formuló en el sistema

adyuvante A indicado más adelante. Este producto se indica como LT-ova en las gráficas.

Preparación del conjugado de LTB-cys/OVA

El antígeno Ovalbúmina de pollo de longitud completa
5 disponible comercialmente (10 mg) se activó usando un exceso
molar 80 veces de SGMBS durante 1 hora a temperatura
ambiente. El exceso de SGMBS se eliminó usando una columna
PD10 (elución con 1 ml de fracciones de amortiguador de DPBS
(NaCl 136.87 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 8.03 mM, KH₂PO₄ 1.47
10 mM pH 7.5), fracciones de 1 ml).

Para la conjugación, las cantidades equimolares de LTB-cys
y la Ovalbúmina activada se hicieron reaccionar durante 1 hora a
temperatura ambiente. El conjugado resultante se purificó
mediante filtración molecular en una columna Sephacryl S-300 HR
15 (elución con amortiguador de DPBS, fracciones de 4 ml). El
conjugado LTB-cys/OVA entonces se formuló en el sistema
adyuvante A indicado más adelante. Este producto se indica
como LTcys-ova en las gráficas.

Método para purificar la subunidad LTB del lisado de *E. coli*:

20 1 l de sedimento bacteriano OD₍₆₂₀₎ 50 en amortiguador de
DPBS sin CaMg se extrajo mediante la prensa de French;
Después de centrifugación 30' a 5000 g, el sobrenadante se
cosecha y trata con 50000 u de benzonasa 1h a temperatura
ambiente. La fracción insoluble se elimina mediante
25 centrifugación 30' 15000 g y filtración 0.22 µm de filtración. El

sobrenadante clarificado se cargó en la columna XK16/20 que contiene 20 ml de resina de galactosa inmovilizada preequilibrada con amortiguador de DPBS sin CaMg, y se lavó con el mismo amortiguador hasta que el OD cae hasta al nivel basal. LTB es
 5 eluido por galactosa 1 M en amortiguador de DPBS sin CaMg. Finalmente, LTB se dializa intensivamente contra amortiguador de DPBS sin CaMg.

Las endotoxinas se eliminan mediante la incubación de la resina Acticlean.

10

Preparación de STxB-Ova Tratada con adyuvante

STxB acoplada a Ovalbúmina de pollo de longitud completa: para permitir el acoplamiento químico de proteínas a un sitio aceptar definido en STxB, una cisteína se agregó al C-terminal de
 15 la proteína tipo silvestre, produciendo STxB-Cys. La proteína STxB-Cys mutante recombinante se produjo como se describió previamente (Haicheur y colaboradores.; 2000, J. Immunol.165, 3301). La concentración de endotoxina determinada por la prueba del análisis de Limulus fue por debajo de 0.5EU/ml. STxB-ova se
 20 ha descrito previamente (HAICHEUR y colaboradores., 2003, Int. Immunol., 15, 1161-1171) y se proporcionó amablemente por Ludger Johannes y Eric Tartour (Curie Institute).

1.2 Preparación de recombinantes de LFn-Siinfekl y LFn-OVA¹⁶¹⁻²⁹¹

25 Se prepararon dos genes sintéticos que contenían los 255

aminoácidos amino terminal de la toxina Ántrax LF flanqueada por una cola 6 x His y cualquier secuencia de codificación Siinfekl o un fragmento de Ovalbúmina mayor que contenga este epítopo (fragmento 161-291) (SEC ID No. 9 y 10, respectivamente). Los productos resultantes se clonaron en un vector de expresión pET para la expresión en E Coli. Las células se recuperaron mediante centrifugación, se concentraron (25 a 40 x) y lisaron usando una prensa de French. Los agregados fueron disociados en urea 6 M durante la noche a 4°C. Para purificar las proteínas recombinantes, se agregaron 5 ml de resina Ni-NTA previamente equilibrada (Qiagen) al lisado, se incubaron 2 horas a 4°C en una rueda giratoria y se cargaron sobre una columna desechable de poliprep (BioRad). La columna se lavó tres veces con 15 ml de un amortiguador de NaCl 300 mM, urea 6 M, imidazol 5 mM, fosfato 50 mM, pH8 antes de la elución con 4 x 2 ml del mismo amortiguador que contiene imidazol 500 mM. Las proteínas recuperadas se visualizaron por SDS-Page, tinción de Coomassie y electroinmunotransferencia, y la urea se eliminó mediante diálisis.

SEC ID No. 9

ATGGGCCACCATCACCATCACCATTTCTTCTGGTGCGGGCG	40
GTCATGGTGATGTAGGTATGCACGTAAAAGAGAAAGAGAA	80
AAATAAAGATGAGAATAAGAGAAAAGATGAAGAACGAAAT	120
AAAACACAGGAAGAGCATTTAAAGGAAATCATGAAACACA	160
TTGTAAAAATAGAAGTAAAAGGGGAGGAAGCTGTAAAAA	200

	AGAGGCAGCAGAAAAGCTACTTGAGAAAGTACCATCTGAT	240
	GTTTTAGAGATGTATAAAGCAATTGGAGGAAAGATATATA	280
	TTGTGGATGGTGATATTACAAAACATATATCTTTAGAAGC	320
	ATTATCTGAAGATAAGAAAAAATAAAAGACATTTATGGG	360
5	AAAGATGCTTTATTACATGAACATTATGTATATGCAAAAG	400
	AAGGATATGAACCCGTACTTGTAATCCAATCTTCGGAAGA	440
	TTATGTAGAAAATACTGAAAAGGCACTGAACGTTTATTAT	480
	GAAATAGGTAAGATATTATCAAGGGATATTTTAAGTAAAA	520
	TTAATCAACCATATCAGAAATTTTTAGATGTATTAAATAC	560
10	CATTAAAAATGCATCTGATTCAGATGGACAAGATCTTTTA	600
	TTTACTAATCAGCTTAAGGAACATCCACAGACTTTTCTG	640
	TAGAGTTCTTGGAACAAAATAGCAATGAGGTACAAGAAGT	680
	ATTTGCGAAAGCTTTTGCATATTATATCGAGCCACAGCAT	720
	CGTGATGTTTTACAGCTTTATGCACCGGAAGCTTTTAATT	760
15	ACATGGATAAATTTAACGAACAAGAAATAAATCTATCCGG	800
	ATCCCAGCTTGAGAGTATAATCAACTTTGAAAACTGACT	840
	GAATGGTGA	849

SEC ID No. 10

	ATGGGCCACCATCACCATCACCATCTTCTGGTGCGGGCG	40
20	GTCATGGTGATGTAGGTATGCACGTAAAAGAGAAAGAGAA	80
	AAATAAAGATGAGAATAAGAGAAAAGATGAAGAACGAAAT	120
	AAACACAGGAAGAGCATTTAAGGAAATCATGAAACACA	160
	TTGTAAAAATAGAAGTAAAAGGGGAGGAAGCTGTTAAAAA	200
	AGAGGCAGCAGAAAAGCTACTTGAGAAAGTACCATCTGAT	240
25	GTTTTAGAGATGTATAAAGCAATTGGAGGAAAGATATATA	280

	TTGTGGATGGTGATATTACAAAACATATATCTTTAGAAGC	320
	ATTATCTGAAGATAAGAAAAAATAAAAGACATTTATGGG	360
	AAAGATGCTTTATTACATGAACATTATGTATATGCAAAAG	400
	AAGGATATGAACCCGTACTTGTAATCCAATCTTCGGAAGA	440
5	TTATGTAGAAAATACTGAAAAGGCACTGAACGTTTATTAT	480
	GAAATAGGTAAGATATTATCAAGGGATATTTTAAGTAAAA	520
	TTAATCAACCATATCAGAAATTTTTAGATGTATTAAATAC	560
	CATTAAAAATGCATCTGATTGAGATGGACAAGATCTTTTA	600
	TTTACTAATCAGCTTAAGGAACATCCCACAGACTTTTCTG	640
10	TAGAGTTCTTGGAACAAAATAGCAATGAGGTACAAGAAGT	680
	ATTTGCGAAAGCTTTTGCATATTATATCGAGCCACAGCAT	720
	CGTGATGTTTTACAGCTTTATGCACCGGAAGCTTTTAATT	760
	ACATGGATAAATTTAACGAACAAGAAATAAATCTATCCGG	800
	ATCCGTCCTTCAGCCAAGCTCCGTGGATTCTCAAAGTCA	840
15	ATGGTTCTGGTTAATGCCATTGTCTTCAAAGGACTGTGGG	880
	AGAAAACATTTAAGGATGAAGACACACAAGCAATGCCTTT	920
	CAGAGTGACTGAGCAAGAAAGCAAACCTGTGCAGATGATG	960
	TACCAGATTGGTTTATTTAGAGTGGCATCAATGGCTTCTG	1000
	AGAAAATGAAGATCCTGGAGCTTCCATTTGCCAGTGGGAC	1040
20	AATGAGCATGTTGGTGCTGTTGCCTGATGAAGTCTCAGGC	1080
	CTTGAGCAGCTTGAGAGTATAATCAACTTTGAAAAACTGA	1120
	CTGAATGGACCAGTTCTAATGTTATGGAAGAGAGGAAGAT	1160
	CAAAGTGTACTTACCTCGCATGAAGATGGAGGAAAAATGA	120

Los recombinantes de IFn-Siinfekl (SEC ID No. 9) y LFn-
25 OVA¹⁶¹⁻²⁹¹ (SEC ID No. 10) entonces se formularon en el sistema

adyuvante A indicado más adelante. LFn-Siinfekl se indica como LFSiinfekl en las gráficas.

1.3 Preparación del recombinante ExoA-Siinfekl

Un gen sintético se preparó (SEC ID No. 11 - ver más
5 adelante) que corresponde a una forma no tóxica de la Exotoxina
A (eliminación de E553), en la cual se introduce el epítipo
Siinfekl de modo que sustituya la mayoría del dominio Ib de la
toxina. El producto resultante se clonó en un vector de expresión
pET y se expresó en *E. coli*. La proteína recombinante después
10 se extrajo de los cuerpos de inclusión y se purificó esencialmente
como se describe en FitzGerald y colaboradores., J Biol Chem
273, 9951, 1998.

SEC ID No. 11

ATGGCCGAGGAAGCCTTCGACCTCTGGAACGAATGCGCCAAAGC
15 CTGCGTGCTCGACCTCAAGGACGGCGTGCGTTCCAGCCGCATGA
GCGTCGACCCGGCCATCGCCGACACCAACGGCCAGGGCGTGCTG
CACTACTCCATGGTCCTGGAGGGCGGCAACGACGCGCTCAAGCT
GGCCATCGACAACGCCCTCAGCATCACCAGCGACGGCCTGACCA
TCCGCCTCGAAGGCGGCGTCGAGCCGAACAAGCCGGTGCGCTAC
20 AGCTACACGCGCCAGGCGCGCGGCAGTTGGTCGCTGAACTGGCT
GGTACCGATCGGCCACGAGAAGCCCTCGAACATCAAGGTGTTTCAT
CCACGAACTGAACGCCGGCAACCAGCTCAGCCACATGTCGCCGA
TCTACACCATCGAGATGGGCGACGAGTTGCTGGCGAAGCTGGCG
CGCGATGCCACCTTCTTCGTCAGGGCGCACGAGAGCAACGAGAT
25 GCAGCCGACGCTCGCCATCAGCCATGCCGGGGTTCAGCGTGGTCA

TGGCCCAGACCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCTGGAGCGAATG
GGCCAGCGGCAAGGTGTTGTGCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGG
TCTACAACTACCTCGCCCAGCAACGCTGCAACCTCGACGATACCT
GGGAAGGCAAGATCTACCGGGTGCTCGCCGGCAACCCGGCGAAG
5 CATGACCTGGACATCAAACCCACGGTCATCAGTCATCGCCTGCAC
TTTCCCGAGGGCGGCAGCCTGGCCGCGCTGACCGCGCACCAGG
CTTGCCACCTGCCGCTGGAGACTTTACCCGTCATCGCCAGCCG
CGCGGCTGGGAACAACCTGGAGCAGTGCGGGCTATCCGGTGCAGCG
GCTGGTCGCCCTCTACCTGGCGGGCGCGGCTGTCGTGGAACCAGG
10 TCGACCAGGTGATCCGCAACGCCCTGGCCAGCCCCGGCAGCGGC
GGCGACCTGGGCGAAGCGATCCGCGAGCAGCCGGAGCAGGCCC
GTCTGGCCCTGACCCTGGCCGCCGCCGAGAGCGAGCGCTTCGTC
CGGCAGGGCACCGGCAACGACGAGGCCGGCGCGGCCAACCTGC
ACTGCCAGCTTGAGAGTATAATCAACTTTGAAAACTGACTGAATG
15 GTGCATGCAGGGCCCCGGCGGACAGCGGCGACGCCCTGCTGGAG
CGCAACTATCCCCTGGCGCGGAGTTCCTCGGCGACGGCGGCGA
CGTCAGCTTCAGCACCCGCGGCACGCAGAACTGGACGGTGGAGC
GGCTGCTCCAGGCGCACCGCCAACTGGAGGAGCGCGGCTATGTG
TTCGTCGGCTACCACGGCACCTTCCTCGAAGCGGCGCAAAGCAT
20 CGTCTTCGGCGGGGTGCGCGCGCGCAGCCAGGACCTCGACGCG
ATCTGGCGCGGTTTCTATATCGCCGGCGATCCGGCGCTGGCCTA
CGGCTACGCCCAGGACCAGGAACCCGACGCACGCGGCCGGATC
CGCAACGGTGCCCTGCTGCGGGTCTATGTGCCGCGCTCGAGCCT
GCCGGGCTTCTACCGCACCAAGCCTGACCCTGGCCGCGCCGGAGG
25 CGGCGGGCGAGGTGGAACGGCTGATCGGCCATCCGCTGCCGCT

GCGCCTGGACGCCATCACCGGCCCCGAGGAGGAAGGCGGGCGC
 CTGACCATTCTCGGCTGGCCGCTGGCCGAGCGCACCGTGGTGAT
 TCCCTCGGCGATCCCCACCGACCCGCGCAACGTCGGCGGGCGACC
 TCGACCCGTCCAGCATCCCCGACAAGGAACAGGCGATCAGCGCC
 5 CTGCCGGACTACGCCAGCCAGCCCCGGCAAACCGCCGCGCGAGG
 ACCTGAAGTGA

El recombinante de ExoA-Siinfekl (SEC ID No. 11) entonces se formuló en el sistema adyuvante A indicado más adelante.

1.4 Análisis de unión de galactosa

10 El receptor GM1 de preferencia reconocido por la subunidad B de las toxinas LT es una monosialogangliosida de superficie celular ($\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1-4)(\text{NeuAc}(\alpha 2-3))\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}(\beta 1-1)\text{ceramida}$), donde Gal es galactosa, GalNAc es N-acetilgalactosamina, NeuAc es ácido acetilneuramínico y Glc es
 15 glucosa. El método descrito más adelante involucra una cromatografía de afinidad en un gel de agarosa unido a galactosa disponible comercialmente (Pierce). La galactosa es la porción de carbohidrato terminal de la porción de oligosacárido de GM1 y se cree que representa la estructura mínima reconocida por la
 20 subunidad B de la toxina LT (Sixma y colaboradores *Nature* 355 (1992), p. 561). Este método se utiliza para purificar la subunidad B de la toxina LT directamente del lisado de *E. coli* (ver más adelante): puede por lo tanto asumirse que el análisis de unión de galactosa puede utilizarse para identificar proteínas que
 25 unen el receptor GM 1.

La proteína de interés (en amortiguador de DPBS sin CaMg) se cargó bombeando en una columna XK16/20 (Amersham Biosciences) empaquetada con 12 ml de resina de D-Galactosa inmovilizada (Pierce) previamente equilibrada en el mismo amortiguador. Por lo menos 3 volúmenes del lecho de amortiguador DPBS sin CaMg después son pasados a través de la columna a una velocidad de flujo de operación de 0.5 ml/min. Después del lavado, la proteína de unión se eluyó de la resina con un flujo de D-galactosa 1 M (en amortiguador de DPBS sin CaMg). Las fracciones de 1-ml recolectadas durante el lavado y la elución son analizadas por SDS-Page, tinción de Coomassie y electroinmunotransferencia. Estas técnicas analíticas permiten la identificación de si la proteína está unida a la galactosa, y por lo tanto unirán el receptor GM1. Las fracciones que contienen la proteína de interés pueden reunirse y dializarse contra amortiguador de DPBS sin CaMg para eliminar la D-galactosa.

1.5 Análisis de unión de Galabiosa

El receptor Gb3 de preferencia reconocido por la subunidad B de la toxina Shiga es un glicosfingolípido de superficie celular, globotriaosilceramida ($\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-4$ glucosilceramida), donde Gal es galactosa. El método descrito más adelante se basa en el descrito por Tarrago-Trani (Protein Extraction and Purification 38, pp 170- 176, 2004), e involucra una cromatografía de afinidad en un gel de agarosa unido a galabiosa disponible comercialmente (calbiochem). La galabiosa ($\text{Gal}\alpha 1\text{-}\rightarrow 4\text{Gal}$) es la porción de

carbohidrato terminal de la porción de oligosacárido de Gb3 y se cree que representa la estructura mínima reconocida por la subunidad B de la toxina Shiga. Este método se ha utilizado exitosamente para purificar la toxina Shiga directamente del lisado de *E. coli*. Por lo tanto puede asumirse que las proteínas que unen esta porción unirán el receptor Gb3.

La proteína de interés en el amortiguador de PBS (500 μ l) se mezcla con 100 μ l de resina de galabiosa inmovilizada (Calbiochem) equilibrada previamente en el mismo amortiguador, e incubada durante 30 minutos a 1 hora a 4°C en una rueda giratoria. Después de una primera centrifugación a 5000 rpm durante 1 minuto, el sedimento se lavó dos veces con PBS. El material de unión entonces se eluyó dos veces volviendo a suspender el sedimento final en 2 x 500 μ l de glicina 100 mM pH 2.5. Las muestras que corresponden al flujo pasante, los lavados reunidos y los eluyentes reunidos entonces se analizaron por SDS-Page, tinción de Coomassie y electroinmunotransferencia. Estas técnicas analíticas permiten la identificación de si la proteína está unida a la galabiosa, y por lo tanto unirá el receptor Gb3.

1.6 Preparación de sistemas adyuvantes

1.6.1 Preparación del sistema adyuvante A: QS21 y 3D-MPL.

Una mezcla de lípido (tal como fosfatidilcolina de la yema de huevo o sintética) y colesterol y 3 D-MPL en solvente orgánico, se secó bajo vacío (o alternativamente bajo una

corriente de gas inerte). Una solución acuosa (tal como solución salina amortiguada de fosfato) entonces se agregó, y el recipiente se agitó hasta que todo el lípido estuvo en suspensión. Esta suspensión entonces se sometió a microfluidizado hasta que el tamaño de liposoma se redujo a aproximadamente 100 nm, y después se filtró estéril a través de un filtro de 0.2 μm . La extrusión o sonicación puede sustituir esta etapa.

Normalmente la relación colesterol:fosfatidilcolina fue 1:4 (p/p), y la solución acuosa se agregó para dar una concentración de colesterol final de 5 a 50 mg/ml.

Las liposomas tienen un tamaño alrededor de 100 nm. Las liposomas por sí mismas son estables durante el tiempo y no tienen ninguna capacidad fusogénica. La cantidad estéril de liposomas se mezcló con QS21 en solución acuosa con una proporción chol/QS21 igual a 5/1 (p/p). Esta mezcla se refiere como DQMPLJn. La DQMPLJn entonces se diluye en PBS para lograr una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ de 3D-MPL. La composición de PBS fue PO_4 : 50 mM; NaCl: 100 mM pH 6.1. Entonces se agregó vector no-vivo. Entre cada adición del componente, el producto intermediario se agitó durante 5 minutos. El pH se comprobó y ajustó si era necesario a 6.1 $\pm$ 0.1 con NaOH o HCl.

El volumen de inyección de 50 μl correspondió a una dosis de antígeno determinada (dosis alta descrita en la tabla siguiente), 05 μg de 3 D-MPL y QS21 y 5 μg de CpG. Estas

formulaciones entonces se diluyeron en una solución de 3D-MPL y de QS21 (a una concentración de 10 y 10 µg/ml respectivamente) para obtener intervalos-dosis de antígeno como se describe en la tabla.

5	Antígeno	Intervalo-dosis de antígeno (µg)	MPL (µg)	QS21 (µg)	Muestra en la figura
	LF-OVA (161-91)	5, 1 y 0.2	0.5	0.5	
	LF-Siinfekl	5, 1 y 0.2	0.5	0.5	40 a 42
	LT_OVA	2, 1 y 0.5	0.5	0.5	1 a 35
10	LT-Cys-OVA	2, 1 y 0.5	0.5	0.5	1 a 18
	LT-Cys-OVA-Gal	2, 1 y 0.5	0.5	0.5	19 a 34
	ExoA-Siinfekl	5, 1 y 0.2	0.5	0.5	40 a 42
	LT-Siinfekl	1, 0.1 y 0.05	0.5	0.5	39

15 **1.6.2 Sistema adyuvante G: CpG2006**

El CpG en masa estéril se agregó a la solución de PBS o NaCl 150 mM para alcanzar una concentración final de 100 µg/ml.

El antígeno entonces se agregó para alcanzar una concentración final de 10 µg/ml. El CpG usado fue 24-mers con la siguiente secuencia 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3' (SEC ID No. 4). Entre cada adición del componente, el producto
20 intermediario se agitó durante 5 minutos. El pH se comprobó y ajustó si es necesario a 6.1 a +/- 0.1 con NaOH o HCl.

El volumen de inyección de 50 µl correspondió a 0.5 µg de
25 cada uno de los vectores conjugados (LT-OVA y StX-OVA) y 5 µg

de CpG (). Los datos se muestran en la figura 35 y 36.

1.5.3 Sistema adyuvante H: QS21, 3D-MPL y CpG2006

El CpG en masa estéril se agregó a la solución de PBS para alcanzar una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$. La composición de PBS fue PO_4 : 50 mM; NaCl: 100 mM pH 6.1. Los antígenos entonces se agregaron para alcanzar una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$. Finalmente, QS21 y 3 D-MPL se agregaron como una premezcla de liposomas en masa estériles que contienen 3 D-MPL y QS21 referidos como DQMPLin para alcanzar las concentraciones de 3D-MPL y QS21 finales de 10 $\mu\text{g/ml}$. El CpG usado fue 24-mers con la siguiente secuencia 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3' (SEC ID No. 4). Entre cada adición del componente, el producto intermediario se agitó durante 5 minutos. El pH se comprobó y ajustó si es necesario a 6.1 a ± 0.1 con NaOH o HCl.

El volumen de inyección de 50 μl correspondió a 1 μg de los vectores conjugados (LT-OVA y STX-OVA), 0.5 μg de 3 D-MPL y QS21 y 5 μg de CpG. Estas formulaciones entonces se diluyeron en una solución de 3D-MPL/QS21 y CpG (a una concentración de 10, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente) para obtener dosis de 0.5, 0.1 y 0.02 μg de antígeno, (estas formulaciones usadas para los experimentos se muestran en las figuras 35 y 36).

Ejemplo 2; vacunación de ratones C57/B6 con vacunas de la invención:

Las formulaciones descritas antes se utilizaron para vacunar

ratones hembra (H2Kb) C57BL/B6 de 6-8 semanas de edad (10/grupo). Los ratones recibieron dos inyecciones espaciadas 14 días y se sangraron en puntos de tiempo específicos entre la semana 1 y la semana 12 como se indica en las gráficas. Los ratones se vacunaron intramuscularmente (inyección en el músculo gastrocnemio izquierdo de un volumen final de 50 μ l) con formulación ex-tiempo. El adenovirus recombinante antigénico se inyectó en una dosis de 10^8 a $5 \cdot 10^8$ VP. En varios puntos de tiempo después de la inmunización, varias lecturas inmunológicas se realizaron como se describe más adelante.

2.1 Ensayos inmunológicos:

PRINCIPIO TECNOLÓGICO

• PRINCIPIO DEL TETRAMERO:

El ensayo del **tetrámero** es la medida de la frecuencia del TCD8 específico de epítipo mediante citometría de flujo. Este procedimiento tiene la ventaja de analizar células linfoides sin ninguna etapa de cultivo *in vitro*. Las células linfoides se incubaron con un anticuerpo anti-CD8 así como con un tetrámero de péptido/MHC (que contiene los péptidos SIINFEKL inmunodominantes unidos al tetrámero H-2Kb, un complejo capaz de la unión de TCR específica), ambos fluoro-marcados. Los resultados se expresan como frecuencia del linfocito T tetrámero+ CD8+ dentro de la población de células TCD8+.

• PRINCIPIO DE ICS:

El ICS (Intracellular Cytokine Staining (Tinción de Citocina

Intracelular)) es la tecnología que permite la cuantificación de los linfocitos T específicos de antígenos con base en la producción de citocina. Las células linfoides son reestimuladas 18H *in vitro* con péptido(s) en presencia de un inhibidor de secreción (brefeldina). Estas células entonces son procesadas por el procedimiento de inmunofluorescencia convencional usando anticuerpos fluorescentes (CD4, CD8, IFNg, IL2 y TNFa). Los resultados se expresan como frecuencia de la célula positiva de citocina dentro las células T CD4 y CD8.

10 • **PRINCIPIO DE CMC:**

CMC *in vivo* (detección de Citotoxicidad Mediada de Células *in vivo*) es un ensayo que supervisa la actividad citotóxica específica del antígeno sin ninguna manipulación de la célula ejecutora. Se basa en la inyección intravenosa de dos poblaciones celulares marcadas CFSE – células objetivo de control y células objetivo pulsadas con el péptido de unión de MHC clase I derivado del antígeno - en la corriente sanguínea de animales vacunados (Aichele y colaboradores. 1997). Los objetivos son células linfoides de ratones inocuos que son marcados con 2 concentraciones diferentes de CFSE. 18H después de la inyección de células objetivo, los ratones se sacrifican, la muestra de sangre de ratones vacunados se recolecta. Los PBLs entonces se analizan usando citometría de flujo.

El porcentaje de actividad citotóxica es calculado considerando el número de objetivos específicos del antígeno

sobrevivientes comparado con el objetivo control no específico. Más precisamente, el análisis de FACS en histograma proporciona parámetros tales como M1 y M2 que son respectivamente el número de objetivos no específicos (-) y objetivos específicos (+).

5 El porcentaje de lisis específica del péptido se calcula como sigue:

$$\text{Lisis \%} = 100 - \left(\frac{\text{objetivo específico corregido (+)}}{\text{objetivo control no específico (-)}} \times 100 \right)$$

10

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

El objetivo corregido (+) = número de FACS del objetivo pulsado por péptido adquirido después de la inyección *in vivo*, "normalizado" con respecto a las células objetivo preinyectadas. preiny. = mezcla del objetivo pulsado por péptido (+) y FACS no pulsado (-) adquirida antes de la inyección *in vivo*.

15

PROTOSCOLOS DETALLADOS (modelo Ova)

• Recolección del órgano

o Aislamiento de PBLs

La sangre se tomó de la vena retro-orbital (50 µm por ratón, 10 ratones por grupo) y diluida directamente en medio de RPMI + heparina 1/10 (LEO). PBLs se aislaron con un gradiente de linfoprep (CEDERLANE). Las células después se lavaron, contaron y finalmente se volvieron a suspender en dilución ad hoc en un amortiguador ad hoc (ver más adelante).

20

25 **o Aislamiento de la célula del bazo**

113

Brevemente, las células totales se extrajeron por interrupción del bazo, las células entonces se volvieron a suspender dentro de un volumen mayor de RPMI (5 bazos en 35 ml). Las células del bazo se aíslan a través de un gradiente de linfoprep (CEDERLANE). Los linfocitos entonces se lavaron, se contaron y finalmente se volvieron a suspender en dilución ad hoc en un amortiguador ad hoc (ver más adelante) lavado.

o **Aislamiento de células del ganglio linfático**

Brevemente, las células totales se extrajeron por la interrupción de los ganglios linfáticos drenados. Estas células se lavaron cuidadosamente dos veces, se contaron y finalmente se volvieron a suspender en dilución ad hoc en un amortiguador ad hoc (ver más adelante) lavado.

• **Lectura Inmunológica**

15 o **TETRAMERO**

El aislamiento de PBLs y el método de tinción del tetrámero es el siguiente: la sangre se tomó de la vena retro-orbital (50 μ l por ratón, 10 ratones por grupo) y se diluyó directamente en medio de RPMI + heparina (LEO). PBLs se aislaron a través de un gradiente de linfoprep (CEDERLANE). Las células después se lavaron, contaron y finalmente 1-5 10^5 células se volvieron a suspender en 50 μ l de amortiguador FACS (PBS, FCS 1%, 0.002% de NaN_3) que contienen el anticuerpo CD16/CD32 (BD Biosciences) en concentración final de 1/50 (f.c). Después de 10 minutos, 50 μ l de la mezcla del tetrámero se agregó a la

suspensión celular. La mezcla del tetrámero contiene 1 μ l de tetrámero-PE Siinfekl-H2Kb de Immunomics Coulter. Los anticuerpos Anti-CD8a-PercP (1/100 f.c.) y anti-CD4-APC (1/200 f.c.) (BD Biosciences), también se agregaron en la prueba. Las
 5 células entonces se dejaron durante 10 minutos a 37°C antes de lavarse una vez y se analizaron usando un FACS Calibur™ con software CELLQuest™. 3000 eventos en la barrera de CD8 vivos se adquirieron por prueba.

10 o **TINCIÓN DE CITOCINA INTRACELULAR (ICS).**

La ICS se realizó en muestras de sangre tomadas como se describió antes. Este análisis incluye dos etapas: estimulación ex vivo y tinción. La estimulación del linfocito ex-vivo se realizó en medio completo que es RPMI 1640 (Biowitaker) complementado
 15 con 5% de FCS (Harlan, Holanda), 1 μ g/ml (mezcla:1/500) de cada anticuerpo anti-ratón CD49d y CD28 (BD, Biosciences), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 10 μ g/ml de sulfato de estreptamicina, 10 unidades/ml de sodio de penicilina G (Gibco), 10 μ g/ml de estreptomycin, 50 μ M de B-mercaptoetanol y
 20 100X de aminoácidos no-esenciales diluidos, todos estos aditivos son de Gibco Life technologies. Las estimulaciones del péptido se realizaron siempre a 37°C, 5% de CO₂.

1. Estimulación ex vivo:

Modelo Ova: 5 a 10 10^5 de PBLs se volvieron a suspender
 25 en medio completo complementando un conjunto de 17 péptidos 15-

mer ova (que comprenden 11 péptidos restringidos del MHC clase I diferentes y 6 péptidos restringidos del MHC clase II aquí nombrados conjunto 17) presentes en una concentración de cada uno de 1 $\mu\text{g/ml}$ (= 1/5000 en mezcla). Después de 2 horas, 1 $\mu\text{g/ml}$ (1/50 en mezcla) Brefeldin-A (BD, Biosciences) se agregó durante 5 16 horas y las células se recolectaron después de un total de 18 horas.

2. Tinción:

Las células se lavaron una vez después se tiñeron con anticuerpos anti-ratón todas adquiridas de BD, Biosciences; todas 10 las etapas adicionales se realizaron en hielo. Las células primero se incubaron durante 10 minutos en 50 μl de solución CD16/32 (1/50 f.c, amortiguador FACS). Se agregaron 50 μl de la mezcla 15 marcadora de superficie de células T (1/100 f.c. CD8a perCp, 1/100 f.c. CD4 APC Cy7) y las células se incubaron durante 20 minutos antes de lavarse. Las células se fijaron y permeabilizaron en 200 μl de solución perm/fijado (BD, Biosciences), se lavaron una vez en amortiguador perm/lavado (BD, Biosciences) antes de ser teñidas a 4°C con anti IFN γ -APC 20 (1/50), anti-TNF α -PE (1/100) y anti IL2-FITC (1/50) durante 2 horas o durante la noche. Los datos se analizaron usando un software FACS Calibur™ con CELLQuest™. 3000 eventos en la barrera de CD8 vivos se adquirieron por prueba.

o **ACTIVIDAD CITOTÓXICA MEDIADA POR CÉLULA**
25 **DETECTADA IN VIVO (CMC *in vivo*)**

Para determinar la citotoxicidad específica de Siinfekl, ratones inmunizados y de control se inyectan con una mezcla de objetivos pulsados y no pulsados. **El pulso objetivo es obviamente diferente de acuerdo al modelo antigénico** mientras el etiquetado objetivo es idéntico para todo el modelo antigénico.

Modelo Ova: la mezcla del objetivo consiste de 2 poblaciones de esplenocito y gangliolinfático singenéticos marcados con CFSE diferencialmente, cargadas o no con 1 ng/ml del péptido Siinfekl un péptido 8-mers conocido por ser epítipo restringido de clase I inmuno-dominante.

Para el etiquetado diferencial, carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE; Molecular Probes - Palmoski y colaboradores;2002, J. Immunol. 168, 4391-4398) se utilizó en una concentración de 0.2 μ M ó 2.5 μ M. Ambos tipos de objetivos se reunieron en una proporción 1/1 y se volvieron a suspender a una concentración de 10^8 objetivos/ml. 200 μ l de la mezcla objetivo se inyectaron por ratón en la vena de la cola en un punto de tiempo definido. La citotoxicidad se determinó por el análisis de FACS^R en la sangre (vena yugular) o bazo tomado del animal sacrificado 18 H después de la inyección del objetivo). La lisis porcentaje promedio de las células objetivo cargadas con Siinfekl se calculó con relación a los controles negativos de antígeno con la siguiente fórmula:

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

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

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

El objetivo corregido (+) = número de objetivos pulsados por péptido adquiridos por FACS después de la inyección *in vivo*,
10 corregido para considerar el número de células preiny+ en la mezcla preinyectada (ver antes)

o **Título de anticuerpo específico de Ag (análisis del suero reunido o suero individual de IgG total): ELISA.**

El análisis serológico se determinó 15 días después de la
15 segunda inyección. Los ratones (10 por grupo) se sangraron por picadura retro-orbital. Las placas que se utilizaron fueron placas de 96 pozos (NUNC, placas Immunosorbant), su revestimiento es diferente de acuerdo al modelo de antígeno:

El IgG total de anti-ova y anti-LTcys se midió por ELISA.
20 Las placas de 96 pozos se cubrieron con el antígeno durante la noche a 4°C (50 µl por pozo de soluciones del antígeno respectivamente ova 10 µg/ml y LTxB-cys 2 µg/ml en PBS).

Las placas después se lavaron en amortiguador de lavado (PBS / 0.1 de Tween 20 (Merck) y se saturó con 100 µl ó 200 µl
25 de amortiguador de 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 amortiguador de lavado, se agregaron 50 μ l o 100 μ l (función del modelo) o suero de ratón diluido y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Después de otros tres lavados, las placas se incubaron durante otra hora a 37°C con IgG total de anti-ratón biotinilado diluido 1000 veces en amortiguador de saturación. Después de la saturación las placas de 96 pozos se lavaron otra vez como se describe antes.

A. Revelación de ELISA de anti-Ova

Las placas después se lavaron en amortiguador de lavado (PBS / 0.1% de Tween 20 (Merck)) y se saturaron con 100 μ l ó 200 μ l de amortiguador de 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 amortiguador de lavado, se agregaron 50 μ l (función del modelo) de suero de ratón diluido y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Después de otros tres lavados, las placas se incubaron por otra hora a 37°C con IgG total de anti-ratón biotinilado diluidos 1000 veces en amortiguador de saturación. Después de la saturación las placas de 96 pozos se lavaron otra vez como se describe antes. Se agregó una solución de estreptavidina-peroxidasa (Amersham) diluida 1000 veces en amortiguador de saturación, 50 μ l por pozo. El último lavado fue un lavado de 5 etapas en amortiguador de lavado.

Finalmente, se agregaron 50 μ l de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina en amortiguador ácido concentración de

H₂O₂ es 0.01% - BIORAD) por pozo y las placas se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos. Para detener la reacción, se agregaron 50 µl de H₂SO₄ 0.4N por pozo. La absorbancia se leyó en una longitud de onda de 450/630 nm por un lector de placa de Elisa de BIORAD. Los resultados se calcularon usando el software softmax-pro.

B. Revelación de ELISA de anti-LTxBcys

Las placas después se lavaron en el amortiguador de lavado (PBS / 0.1% de Tween 20 (Merck)) y se saturaron con 100 µl ó 200 µl de amortiguador de saturación (PBS / 0.1% de Tween 20 / 1% BSA / 10% de FCS) durante 1 hora a 37°C. Después de 3 lavados adicionales en el amortiguador de lavado, se agregaron 100 µl del suero de ratón diluido y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Después de otros tres lavados, las placas se incubaron durante otra hora a 37°C con IgG total de anti-ratón biotinilado diluido 1000 veces en amortiguador de saturación. Después de la saturación las placas de 96 pozos se lavaron otra vez como se describe antes. Se agregó una solución de estreptavidina-peroxidasa (Amersham) diluida 2000 veces en amortiguador de saturación, 100 µl por pozo. El último lavado fue un lavado de 5 etapas en amortiguador de lavado.

Finalmente, se agregaron 100 µl de OPDA (se agregaron extemporal 37.5 µl de Citrato de Na – 0.05% de Tween – pH 4.5 + 15 mg de OPDA + 37.5 µl de H₂O₂) por pozo y la placa se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 20

minutos. Para detener la reacción, se agregaron 100 μ l de H₂SO₄ 2N por pozo. La absorbancia se leyó en una longitud de onda de 490/630 nm por un lector de placa de Elisa de BIORAD. Los resultados se calcularon usando el software softmax-pro.

5 3. Resultados

Los resultados descritos más adelante muestran que usando cualquiera de LT-ova, LTcys-ova o LTSiinfekl, la eficacia de un sistema de vector no vivo para inducir las respuestas de CD8 puede mejorarse combinándolo con el sistema adyuvante A, H o

10 G.

Evaluación de la respuesta con el sistema adyuvante A

Las Figuras 1 a 5 y 19 a 22 muestran la respuesta de CD8+ a Ova cuando se conjuga a LT o LTcys con y sin el adyuvante ASA. Las gráficas muestran que una inmunorespuesta mejorada

15 contra Ova es observada cuando se conjuga al vector LTB o el LTBcys en combinación con un adyuvante, comparado con la respuesta vista con cualquier ovalbúmina vectorizada no tratada con adyuvante u ovalbúmina no vectorizada administrada con el sistema adyuvante A. Esta respuesta mejorada se observa 6 días

20 después de la primera inyección para LT-ova (figuras 1 y 19), 14 días después de la primera inyección para LTcys-ova (figuras 2 y 20) y hasta el día 88 después de la segunda inyección (figuras 3-5 y 21-22).

Las Figuras 6 a 9 y 23-26 muestran que las frecuencias de

25 células T CD8+ que producen citocina específica de antígeno se

incrementan cuando la ovalbúmina se conjuga al vector LTB o LTBCys y se inyecta en combinación con el adyuvante ASA con respecto a la respuesta inducida por la ovalbúmina conjugada sola o la ovalbúmina no-vectorizada administrada con el sistema adyuvante A. Esta mejora es más marcada los 6 a 60 días después de la segunda inyección (figuras 7 y 8).

Las figuras 10-13 y 27-30 ilustran las células T CD4+ mejoradas cuando el antígeno vectorizado se utiliza en combinación con ASA comparado con las composiciones no-vectorizadas o no-tratadas con adyuvantes. El porcentaje más mejorado de células T CD4+ específicas de Ova se ven 14 días después de la primera inyección (figuras 10 y 28) y 6 días después de la segunda inyección (figuras 11 y 29).

Las Figuras 14, 31 y 32 muestran que la actividad citotóxica específica de Siinfekl detectada *in vivo* está mejorada cuando el antígeno es vectorizado y administrado con un adyuvante como se probó ya sea 21 días después de la primera inyección (figura 31) o 12 (figura 14) o 65 (figura 32) días después de la segunda inyección.

Las figuras 15, 17 y 33 muestran a respuesta humoral a Ova 14 días después de la segunda inyección. La respuesta del anticuerpo contra ova detectada solamente cuando el antígeno vectorizado es tratado con adyuvante. No se observa ninguna respuesta mejorada del anticuerpo contra ova cuando el antígeno se conjugó a LT o LTcys y se administró con ASA con respecto a

la ovalbúmina sin conjugar con adyuvante. Las figuras 16, 18 y 34 muestran que una respuesta del anticuerpo anti-LT es elevada por el antígeno vectorizado tratado con adyuvante.

5 **Evaluación de la respuesta a LTcys-ova purificada de galactosa**

Los productos de conjugación son generalmente heterogéneos y pueden por ejemplo contener cantidades variables de conjugados de LT que han perdido la capacidad de unir al receptor GM1. Las figuras 19-26 muestran que los conjugados
10 LTcys-ova purificados por filtración molecular pueden purificarse adicionalmente por afinidad de galactosa y todavía muestran una respuesta de CD8 mejorada comparada con la ovalbúmina tratada con adyuvante sin conjugar, que es mejor vista los 14 días después de la primera inyección (figura 20).

15 Además, las figuras 31 y 32 muestran que un conjugado purificado induce una actividad citotóxica mejorada de Siinfekl detectada *in vivo* cuando se administra con un adyuvante como se probó ya sea 21 días después de la primera inyección (figura 31) o 65 días (figura 32) después de la segunda inyección.

20 La figura 33 muestra que no se observó respuesta del anticuerpo mejorada contra ova cuando el antígeno se conjugó a LT o LTcys y se administró con ASA con respecto a la ovalbúmina no conjugada tratada con adyuvante.

La figura 34 muestra que una respuesta del anticuerpo anti-
25 LT es elevada cuando el antígeno vectorizado es tratado con

adyuvante.

Evaluación de la respuesta con el sistema adyuvante H y G

Las figuras 35 y 36 comparan StxB-ova y LT-ova con y sin sistemas adyuvantes A, H y G. Los datos muestran claramente que la respuesta al antígeno conjugado ya sea a StxB o LT-B es aumentada cuando se administra con estos tres sistemas adyuvantes (figura 35) y en diferentes dosis con ASH (figura 36). Los datos demuestran, junto con los resultados anteriores, que el efecto de incluir cualquier sistema adyuvante aumenta la respuesta a LT-ova similarmente a StxB-Ova. Es por lo tanto posible, con referencia a la Solicitud de patente WO2005/112991, extrapolar que la adición de los adyuvantes listados en el documento WO2005/112991 mostrarán la inmunorespuesta mejorada con los antígenos conjugados LTB similarmente a los vistos con StxB.

Evaluación de la respuesta utilizando vectores no-vivos alternativos con el sistema adyuvante A

Los resultados (métodos realizados como en 1, 1-3 anteriores) muestran que, medida a los 7 días después de una primera inyección, una respuesta CD8 aumentada se ve mejor con LT-Siinfekl tratado con adyuvante con AS, que la que se ve con Siinfekl no-vectorizado adjuvantado o LT-Siinfekl solamente (figura 37). Esta mejora se ve en dosis tan bajas como 0.1 μ g de LT-Siinfekl. La misma se ve con LF-Siinfekl (figura 40), y con ExoA-Siinfekl (figura 42). Sin embargo, esta mejora no se ve

124

cuando se midió 15 días después de la 1ª dosis (figuras 38 y 41).

Cuando se observa 7 días después de la segunda inyección, se ve una mejora con LT-Siinfekl (figura 39), LF-Siinfekl y ExoA-Siinfekl (figura 42) cuando se combina con el sistema adyuvante A, en comparación con adyuvante Siinfekl no-vectorizado o Siinfekl LFn o LT o ExoA sin adyuvante.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna que comprende la subunidad B de toxina termo-lábil de *E. coli* o de un derivado de la misma con homología igual o mayor de 90% complejada con un antígeno y un adyuvante.

2. Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1, en donde la subunidad B de toxina termo-lábil de *E. coli* o un derivado de la misma con homología igual o mayor de 90% que une el receptor G_{M1}.

3. Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1, en donde el adyuvante se selecciona del grupo de sales metálicas, emulsiones aceite en agua, ligandos de receptor tipo Toll, saponinas o combinaciones de los mismos.

4. Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 3, en donde el adyuvante es un ligando del receptor tipo Toll.

5. Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 4, en donde el ligando del receptor tipo Toll es un agonista.

6. Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1, en donde el antígeno y la subunidad B de toxina termo-lábil de *E. coli* o un derivado de la misma con homología igual o mayor de 90%, están covalentemente unidos.

126

7. Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1, en donde el antígeno y la subunidad B de toxina termo-lábil de *E. coli* o un derivado de la misma con homología igual o mayor de 90%, se unen como una proteína de fusión.

5 8. Una composición de vacuna de conformidad con cualquier reivindicación precedente, en donde el adyuvante se selecciona del grupo de: sales metálicas, una saponina, lípido A o derivado del mismo, un aminoalquilo glucosaminida fosfato, un oligonucleótido inmunoestimulante o combinaciones de los
10 mismos.

9. Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 8, en donde la saponina se presenta como Iscom, en una emulsión aceite en agua o en asociación con una liposoma.

15 10. Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 8 ó 9, en donde la saponina es QS21.

11. Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 8, en donde el derivado del lípido A se selecciona del Monofosforil lípido A, Monofosforil lípido A 3 desacilado, OM
20 174, OM 197, OM 294.

12. Una composición de vacuna de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el adyuvante es una combinación de por lo menos un representante de dos de los siguientes grupos,

25 i) una saponina,

ii) un ligando del receptor 4 tipo Toll, y

iii) un ligando del receptor 9 tipo Toll.

13. Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 12, en donde la saponina es QS21 y el ligando del receptor 4 tipo Toll es monofosforil lípido A 3 desacilado y el
5 ligando del receptor 9 tipo Toll es CpG que contiene el oligonucleótido inmunoestimulante.

14. Una composición de vacuna de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el antígeno se
10 selecciona del grupo de antígenos que proporcionan la inmunidad contra el grupo de enfermedades seleccionadas de, patógenos intracelulares o enfermedades proliferativas.

15. Una composición de vacuna que comprende un vector no-vivo derivado de una toxina bacteriana o un derivado
15 inmunológicamente funcional de la misma con un antígeno y un adyuvante para el uso en medicina.

16. Uso de la subunidad B de toxina termo-lábil de *E. coli* o de un derivado de la misma con homología igual o mayor de 90% que une el receptor G_{M1} complejoado con un antígeno y un
20 adyuvante para la fabricación de una vacuna para la prevención o tratamiento de la enfermedad.

17. El uso de conformidad con la reivindicación 16, para elevar una respuesta CD8 específica del antígeno.

18. Un método para tratar o prevenir la enfermedad que
25 comprende administrar a un paciente que sufre o es susceptible a

la enfermedad, una composición de vacuna de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

19. Un método para elevar una inmunorespuesta de CD8 específica de antígeno que comprende la administración a un
5 paciente de una vacuna de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

20. Un proceso para la producción de una vacuna de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde un antígeno complejo con la subunidad B de toxina
10 termo-lábil de *E. coli* o de un derivado de la misma con homología igual o mayor de 90% que une el receptor G_{M1}, se mezcla con un adyuvante.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Dewerchin, Marianne
 <120> **VACUNAS**
 <130> VB61411
 5 <140> PCT/GB2006/001832
 <141> 2006-05-18
 <160> 11
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> motivo CpG no metilado artificial
 <400> 1
 dtccatgacg ttcctgacgt t 21
 <210> 2
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> motivo CpG no metilado artificial
 <400> 2
 dtctcccagc gtgcgccat 19
 <210> 3
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> motivo CpG no metilado artificial
 <400> 3
 daccgatgac gtcgcccgtg acggcaccac g 31
 <210> 4
 <211> 25
 25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> motivo CpG no metilado artificial

<400> 4

dtcgtcgttt tgtcgttttg tcggtt

25

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> motivo CpG no metilado artificial

<400> 5

dtccatgacg ttcctgatgc t

21

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> motivo CpG no metilado artificial

<400> 6

dtcgacgttt tcggcgcgcg ccg

23

<210> 7

<211> 379

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> subunidad B de toxina termo-lábil de Escherichia Coli -
vector cys

<400> 7

datgaataaaa	gtaaaatggt	atgtttttatt	tacggcggtta	ctatcctctc	tatgtgcata	60
cggagctccc	cagtctatta	cagaactatg	ttcggaatat	cgcaacacac	aaatatatac	120
gataaatgac	aagatactat	catatacgga	atcgatggca	ggcaaaagag	aaatgggttat	180
cattacattt	aagagcggcg	caacattttca	ggtcgaagtc	ccgggcagtc	aacatataga	240
ctcccaaaaa	aaagccattg	aaaggatgaa	ggacacatta	agaatcacat	atctgaccga	300
gaccaaatt	gataaattat	gtgtatggaa	taataaaacc	cccaattcaa	ttgcgggaat	360
cagtatggaa	aactgctaa					379

<210> 8

<211> 430

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> subunidad B de toxina termo-lábil de Escherichia Coli
- vector SIINFEL

<400> 8

```

datgaataaa gtaaaatggt atgttttatt tacggcggtta ctatcctctc tatgtgcata 60
cggagctccc cagtctatta cagaactatg ttcggaatat cgcaacacac aaatatatac 120
gataaatgac aagatactat catatacgga atcgatggca ggcaaaagag aaatgggtat 180
cattacattt aagagcggcg caacatttca ggtcgaagtc ccgggcagtc aacatataga 240
ctcccaaaaa aaagccattg aaaggatgaa ggacacatta agaatcacat atctgaccga 300
gaccaaattt gataaattat gtgtatggaa taataaaacc cccaattcaa ttgcggcaat 360
cagtatggaa aacagccagc ttgagagtat aatcaacttt gaaaaactga ctgaatggcg 420
cggccgctag                                     430

```

<210> 9

<211> 850

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio de terminal amino de B. Anthracis (Lfn)
recombinante de SIINFEL

<400> 9

```

datgggccac catcaccatc accattcttc tgggtgcgggc ggatcatggtg atgtaggtat 60
gcacgtaaaa gagaaagaga aaaataaaga tgagaataag agaaaagatg aagaacgaaa 120
taaaacacag gaagagcatt taaaggaaat catgaaacac attgtaaaaa tagaagtaaa 180
aggggaggaa gctgttaaaa aagaggcagc agaaaagcta cttgagaaag taccatctga 240
tgtttttagag atgtataaag caattggagg aaagatatat attgtggatg gtgatattac 300
aaaacatata tctttagaag cattatctga agataagaaa aaaataaaaag acatttatgg 360
gaaagatgct ttattacatg aacattatgt atatgcaaaa gaaggatatg aaccctgact 420
tgtaatccaa tcttcggaag attatgtaga aaatactgaa aaggcactga acgtttatta 480
tgaaataggt aagatattat caagggatat tttaagtaaa attaataaac catatcagaa 540
attttttagat gtattaaata ccattaaaaa tgcattctgat tcagatggac aagatctttt 600
atttactaat cagcttaagg aacatcccac agacttttct gtagagttct tggaacaaaa 660
tagcaatgag gtacaagaag tatttgcgaa agcttttgca tattatatcg agccacagca 720
tcgtgatgtt ttacagcttt atgcaccgga agctttttaat tacatggata aattttaacga 780
acaagaaata aatctatccg gatcccagct tgagagtata atcaactttg aaaaactgac 840
tgaatggtga                                     850

```

<210> 10

<211> 1201

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio de terminal amino de B. Anthracis (Lfn)
recombinante de Ovalubumina (161-291)

<400> 10

```

datgggccac catcaccatc accattcttc tgggtgcgggc ggatcatggtg atgtaggtat 60

```

5
10
a

gcacgtaaaa	gagaaagaga	aaaataaaga	tgagaataag	agaaaagatg	aagaacgaaa	120
taaaacacag	gaagagcatt	taaaggaaat	catgaaacac	attgtaaaaa	tagaagtaaa	180
aggggaggaa	gctgttataa	aagaggcagc	agaaaagcta	cttgagaaag	taccatctga	240
tgtttttagag	atgtataaaag	caattggagg	aaagatatat	attgtggatg	gtgatattac	300
aaaacatata	tctttagaag	cattatctga	agataagaaa	aaaataaaaag	acattttatgg	360
gaaagatgct	ttattacatg	aacattatgt	atatgcaaaa	gaaggatatg	aaccgcgtact	420
tgtaatccaa	tcttcggaag	attatgtaga	aaataactgaa	aaggcactga	acgtttatta	480
tgaaataggt	aagatattat	caagggatat	tttaagtaaa	attaatcaac	catatcagaa	540
atthtttagat	gtattaaata	ccattaaaaa	tgcactctgat	tcagatggac	aagatctttt	600
atthtactaat	cagcttaagg	aacatcccac	agacttttct	gtagagtctt	tggaacaaaa	660
tagcaatgag	gtacaagaag	tatttgcgaa	agctttttgca	tattatatcg	agccacagca	720
tcgtgatgtt	ttacagcttt	atgcaccgga	agctttttaat	tacatggata	aattttaacga	780
acaagaaata	aatctatccg	gatccgtcct	tcagccaagc	tccgtggatt	ctcaaactgc	840
aatggttctg	gttaatgcca	ttgtcttcaa	aggactgtgg	gagaaaacat	ttaaggatga	900
agacacacaa	gcaatgcctt	tcagagtgc	tgagcaagaa	agcaaacctg	tcagatgat	960
gtaccagatt	ggtttattta	gagtggcatc	aatggcttct	gagaaaatga	agatcctgga	1020
gcttccattt	gccagtggga	caatgagcat	gttggtgctg	ttgcctgatg	aagtctcagg	1080
ccttgagcag	cttgagagta	taatcaactt	tgaaaaactg	actgaatgga	ccagttctaa	1140
tgttatggaa	gagaggaaga	tcaaagtgtg	cttacctcgc	atgaagatgg	aggaaaaatg	1200
a						1201

<210> 11

<211> 1855

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Forma No Tóxica de la Exotoxina A (supresión de E553), en la cual el epítipo de Siinfekl se introduce de tal forma que reemplaza la mayoría del dominio Ib la toxina

<400> 11

15
25

datggccgag	gaagccttcg	acctctggaa	cgaatgcgcc	aaagcctgcg	tgctcgacct	60
caaggacggc	gtgcgttcca	gccgcatgag	cgctcgacctg	gccatcgccg	acaccaacgg	120
ccaggggcgtg	ctgcactact	ccatggctcct	ggagggcgccg	aacgacgcgc	tcaagctggc	180
catcgacaac	gccctcagca	tcaccagcga	cggcctgacc	atccgcctcg	aaggcggcgt	240
cgagccgaac	aagccggtgc	gctacagcta	cacgcgccag	gcgcgcggca	gttgggtcgt	300
gaactggctg	gtaccgatcg	gccacgagaa	gccctcgaac	atcaaggtgt	tcattccacga	360
actgaacgcc	ggcaaccagc	tcagccacat	gtcgcgcgatc	tacaccatcg	agatggggcga	420
cgagttgctg	gcgaagctgg	cgcgcgatgc	caccttcttc	gtcagggcg	acgagagcaa	480
cgagatgcag	ccgacgctcg	ccatcagcca	tgccgggggtc	agcgtgggtca	tgccccagac	540
ccagccgcgc	cgggaaaagc	gctggagcga	atggggccagc	ggcaaggtgt	tgtgcctgct	600
cgacccgctg	gacgggggtct	acaactacct	cgcccagcaa	cgctgcaacc	tcgacgatac	660
ctgggaaggc	aagatctacc	gggtgctcgc	cggcaaccgc	gcgaagcatg	acctggacat	720
caaaccacag	gtcatcagtc	atcgcttgca	ctttcccgag	ggcggcagcc	tgccgcgcgt	780
gaccgcgcac	caggcttgcc	acctgcccgt	ggagactttc	accgctcatc	gccagccgcg	840
cggctgggaa	caactggagc	agtgcggcta	tccgggtgcag	cggctgggtcg	ccctctacct	900
ggcggcgccg	ctgtcgtgga	accaggtcga	ccaggtgatc	cgcaacgccc	tgccagccc	960
cggcagcggc	ggcgacctgg	gcgaagcgat	ccgcgagcag	ccggagcagg	cccgtctggc	1020
cctgacctg	gccgcgcgcg	agagcgagcg	cttcgtccgg	cagggcaccg	gcaacgacga	1080
ggccggcgcg	gccaacctgc	actgccagct	tgagagtata	atcaactttg	aaaaactgac	1140

5

tgaatggtgc	atgcagggcc	cggcggacag	cggcgacgcc	ctgctggagc	gcaactatcc	1200
cactggcgcg	gagttcctcg	gcgacggcgg	cgacgtcagc	ttcagcacc	gcggcacgca	1260
gaactggacg	gtggagcggc	tgctccaggc	gcaccgcca	ctggaggagc	gcggctatgt	1320
gttcgtcggc	taccacggca	ccttcctcga	agcggcgcaa	agcatcgtct	tcggcgggggt	1380
gcgcgcgcgc	agccaggacc	tcgacgcgat	ctggcgcggt	ttctatatcg	ccggcgatcc	1440
ggcgctggcc	tacggctacg	cccaggacca	ggaacccgac	gcacgcggcc	ggatccgcaa	1500
cggtgccctg	ctgcgggtct	atgtgcccg	ctcgagcctg	ccgggcttct	accgcaccag	1560
cctgaccctg	gccgcgccgg	aggcggcggg	cgaggtcgaa	cggctgatcg	gccatccgct	1620
gccgctgcgc	ctggacgcca	tcaccggccc	cgaggaggaa	ggcgggcgcc	tgaccattct	1680
cggctggccg	ctggccgagc	gcaccgtggt	gattccctcg	gcgatcccca	ccgaccgcgc	1740
caacgtcggc	ggcgacctcg	accggtccag	catccccgac	aaggaacagg	cgatcagcgc	1800
cctgccggac	tacgccagcc	agcccgga	accgccgcgc	gaggacctga	agtga	1855

FIGURA 1

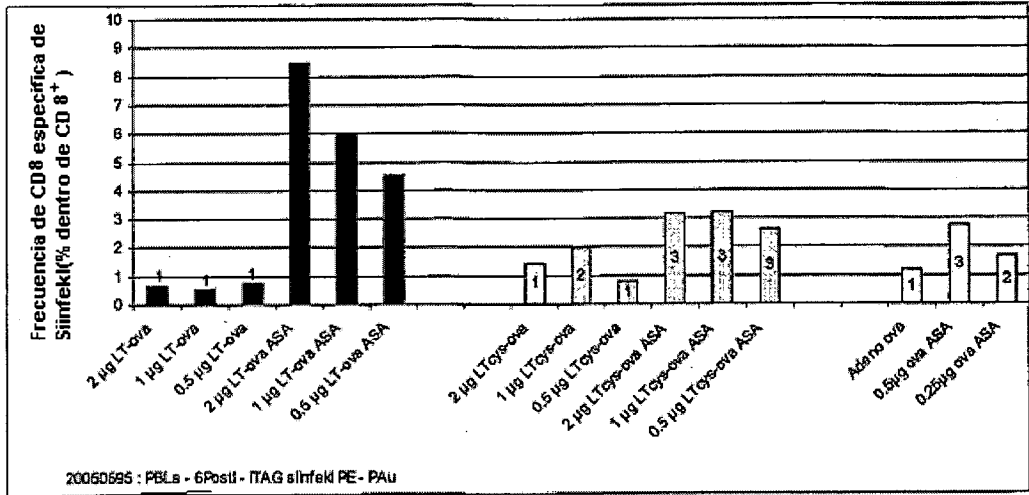
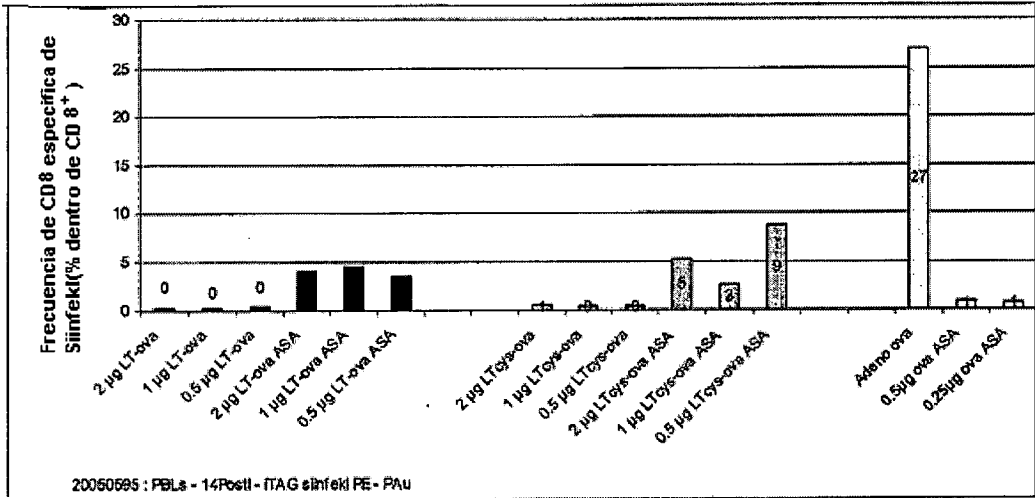


FIGURA 2



5 Figura 3

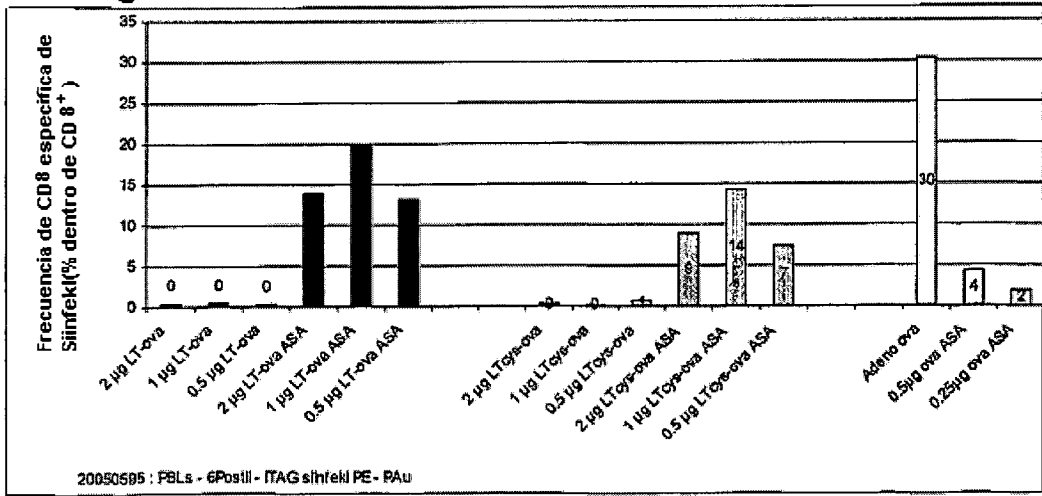


Figura 4

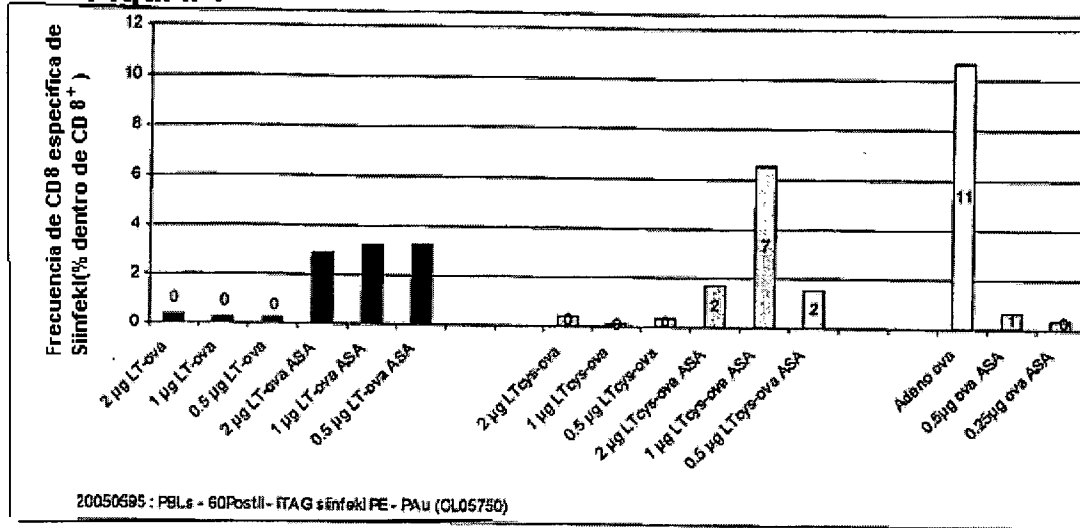
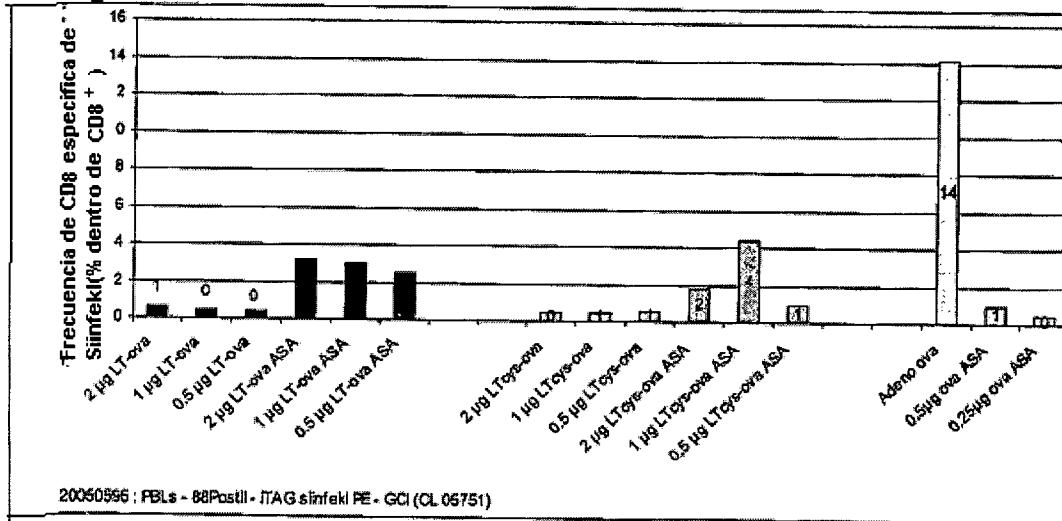


Figura 5



5 Figura 6

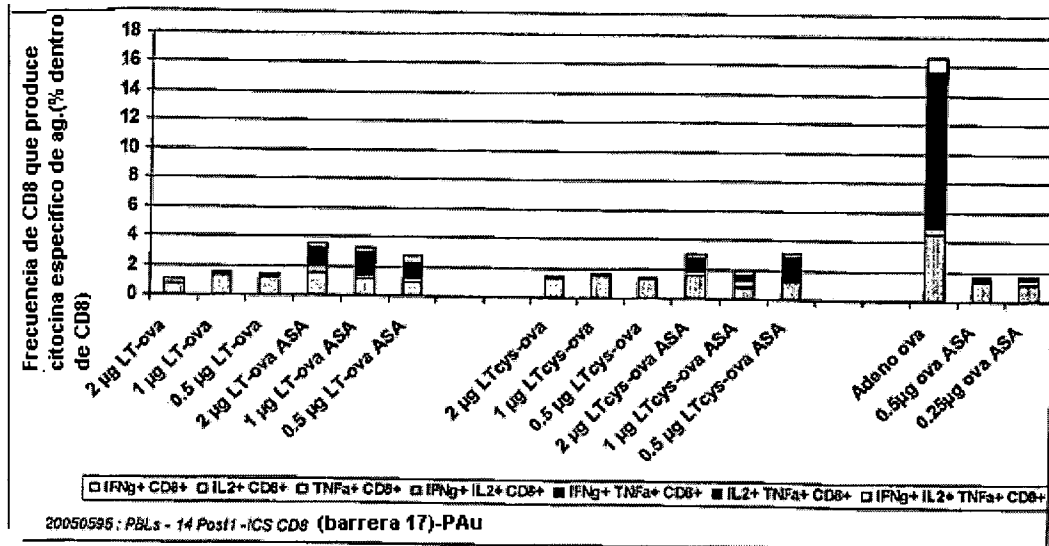


Figura 7

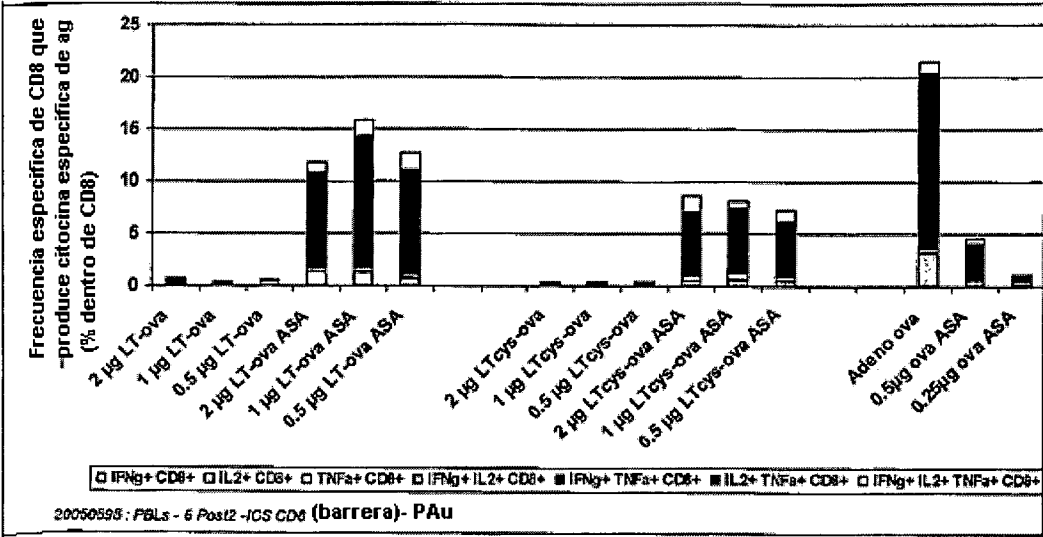


Figura 8

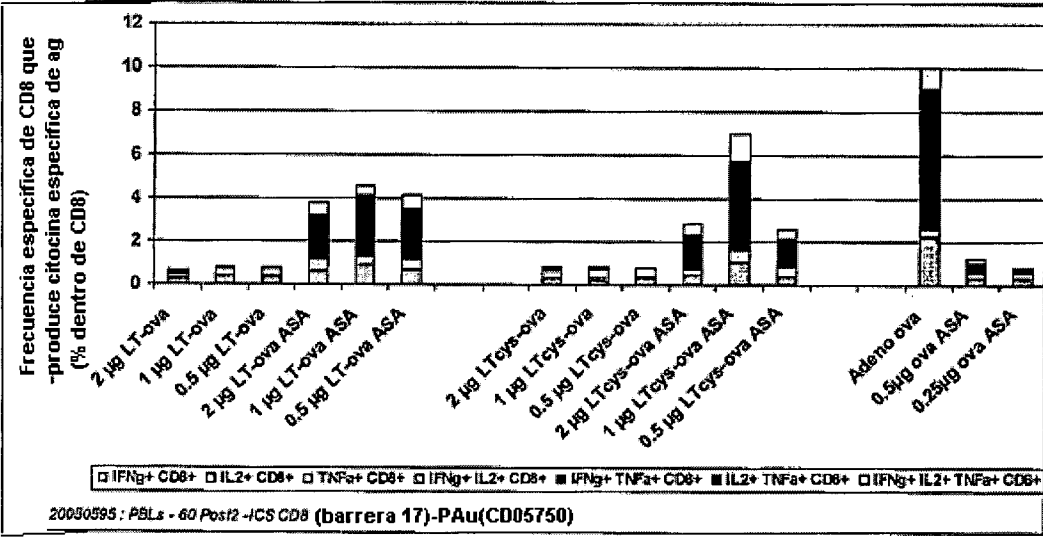


Figura 9

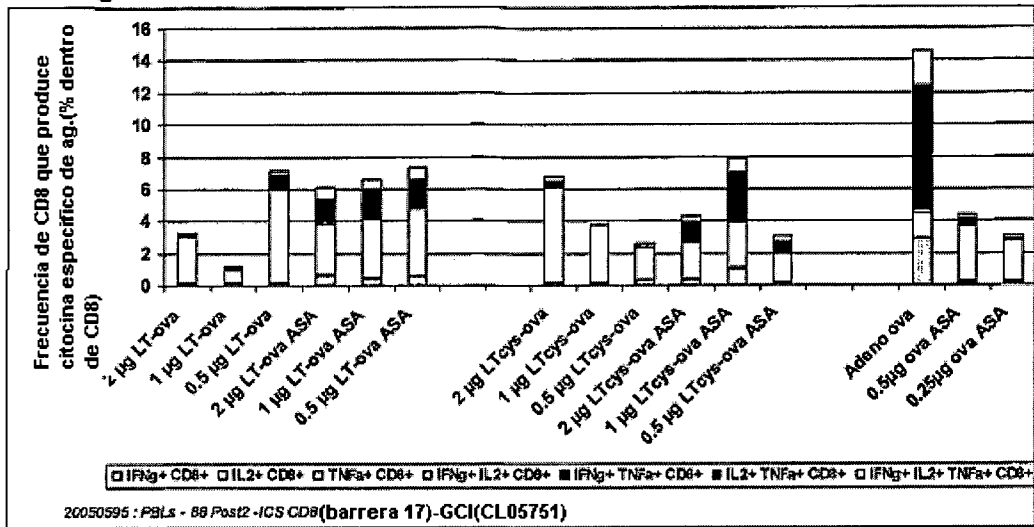


Figura 10

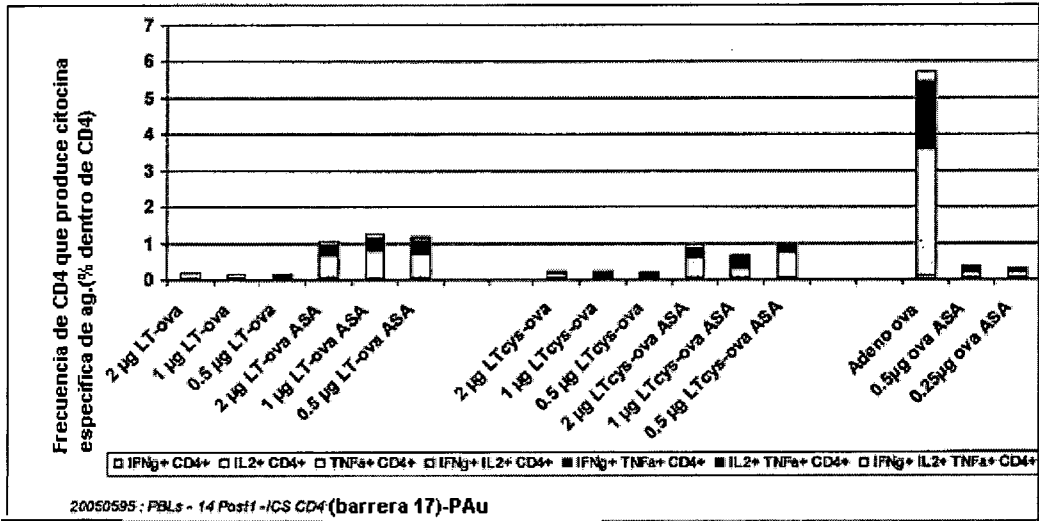


Figura 11

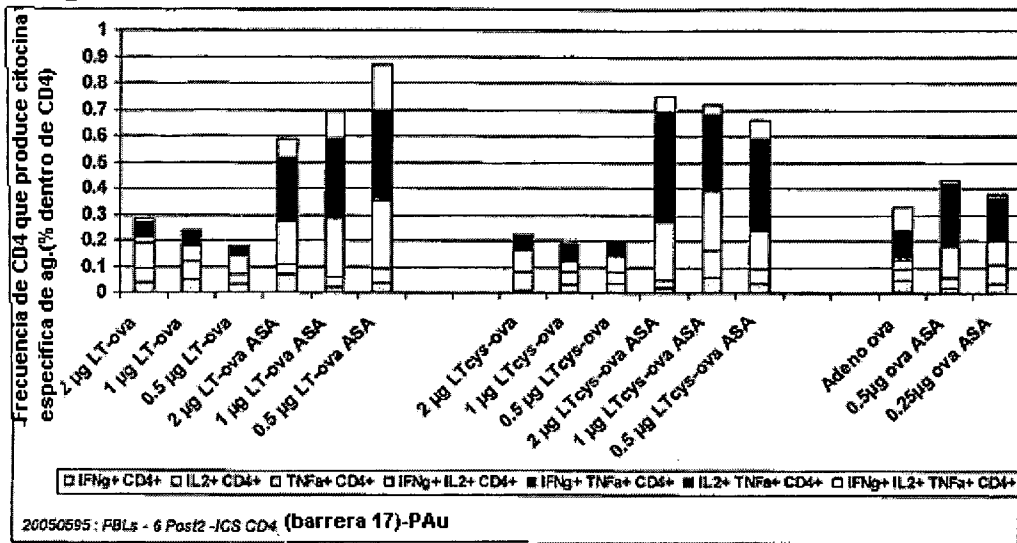


Figura 12

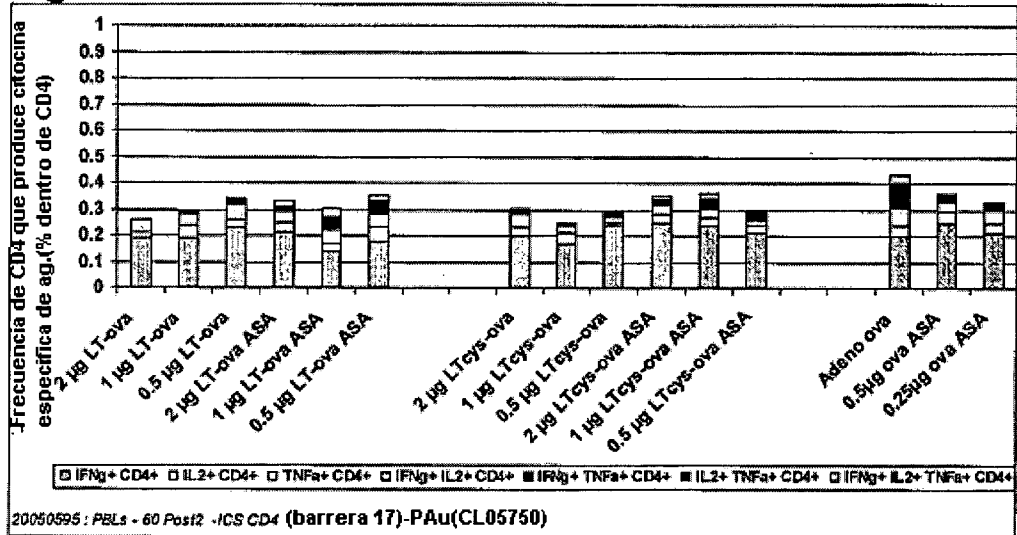


Figura 13

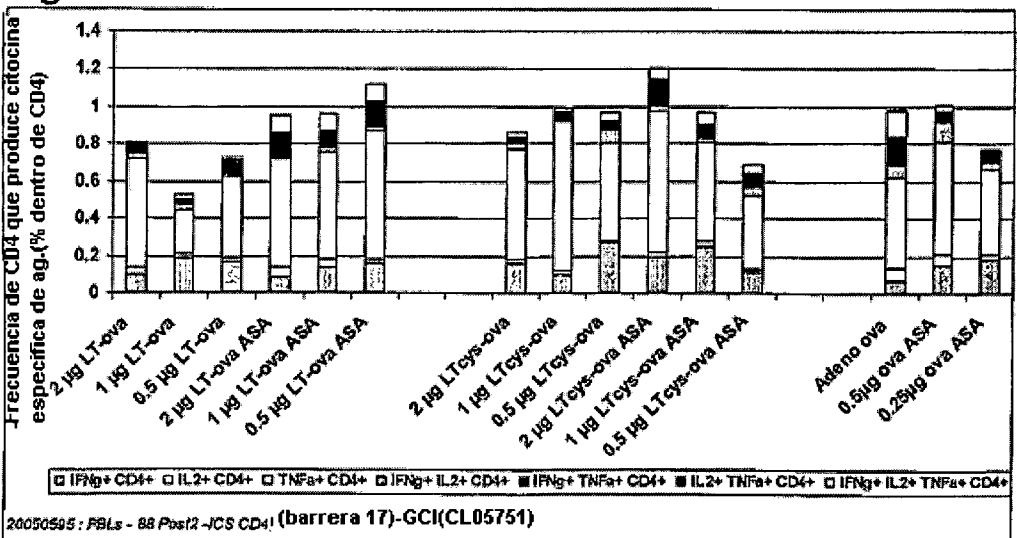


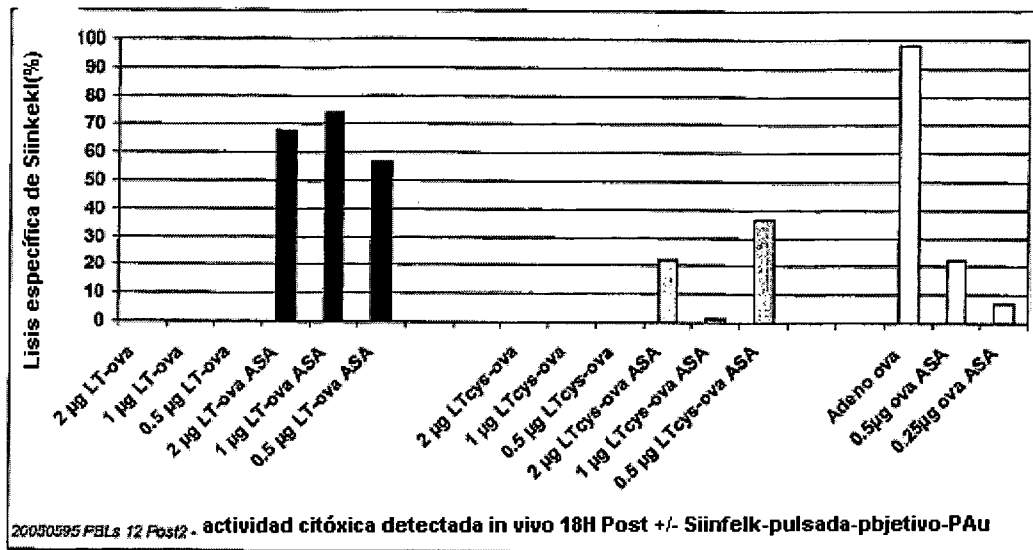
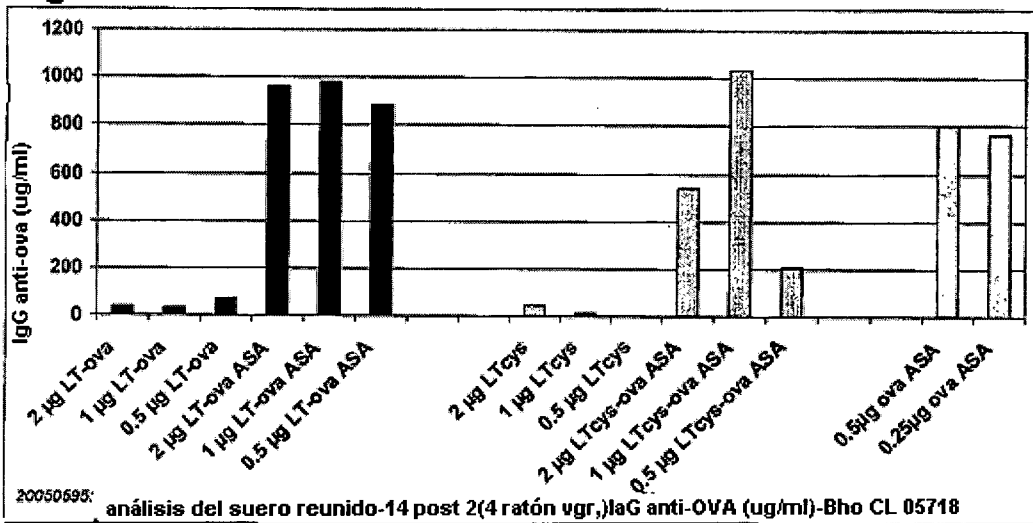
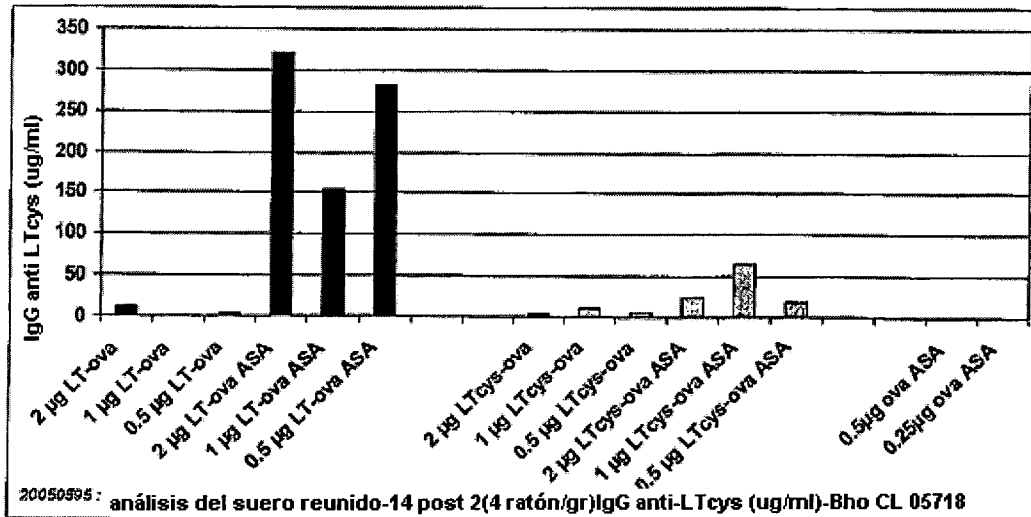
Figura 14**Figura 15****FIGURA 16**

Figura 17

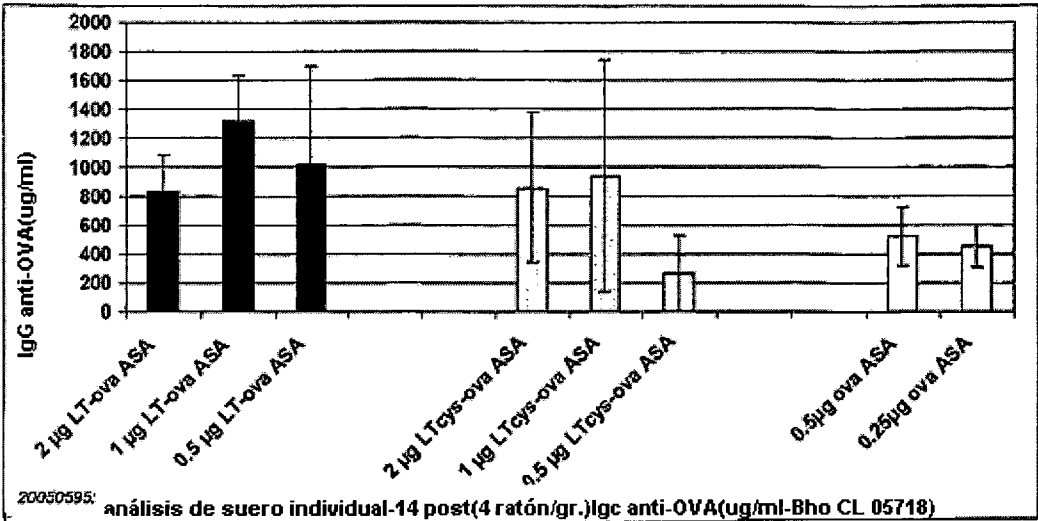


Figura 18

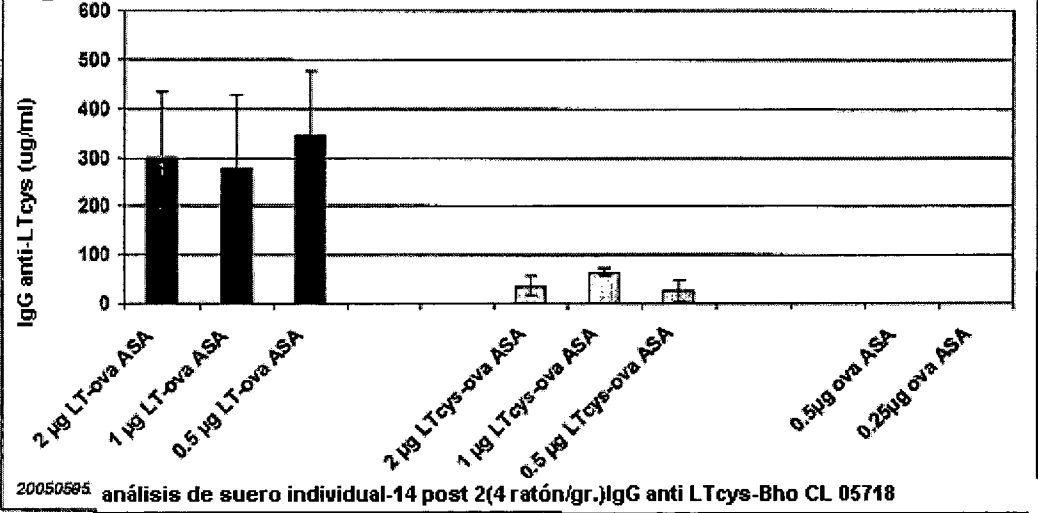


Figura 19

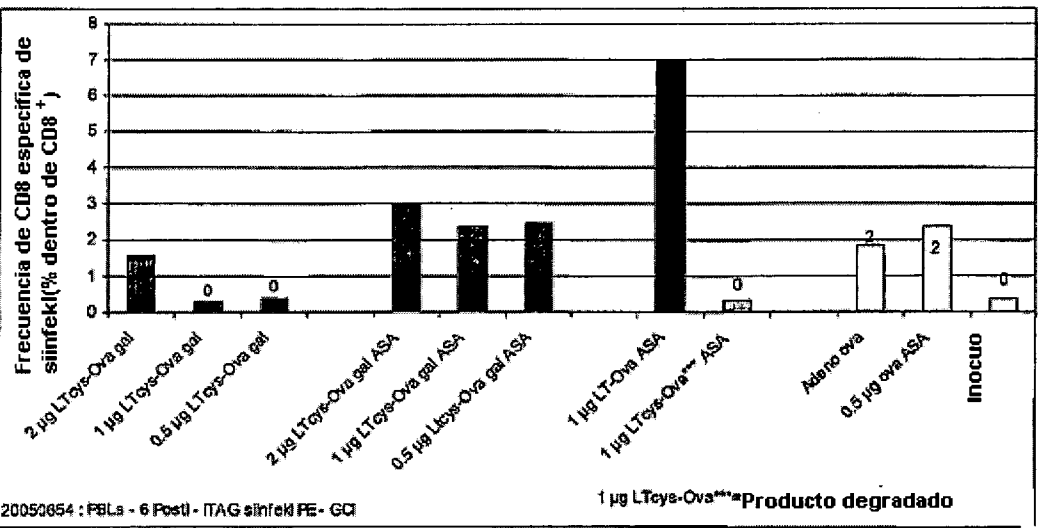


Figura 20

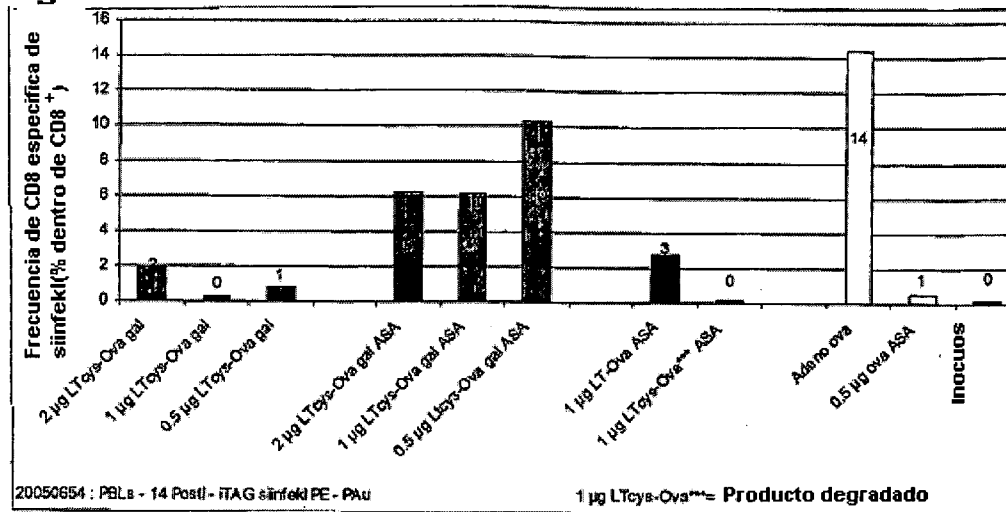


Figura 21

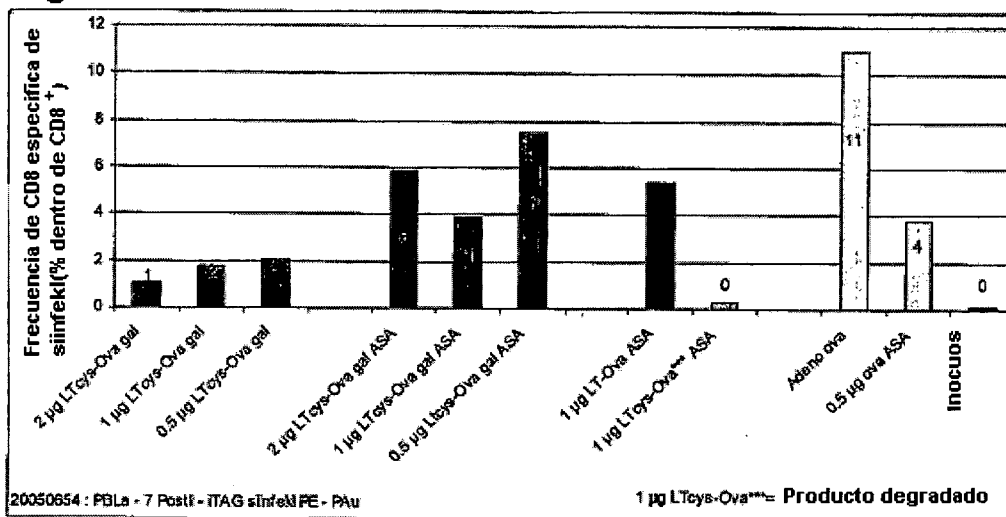


Figura 22

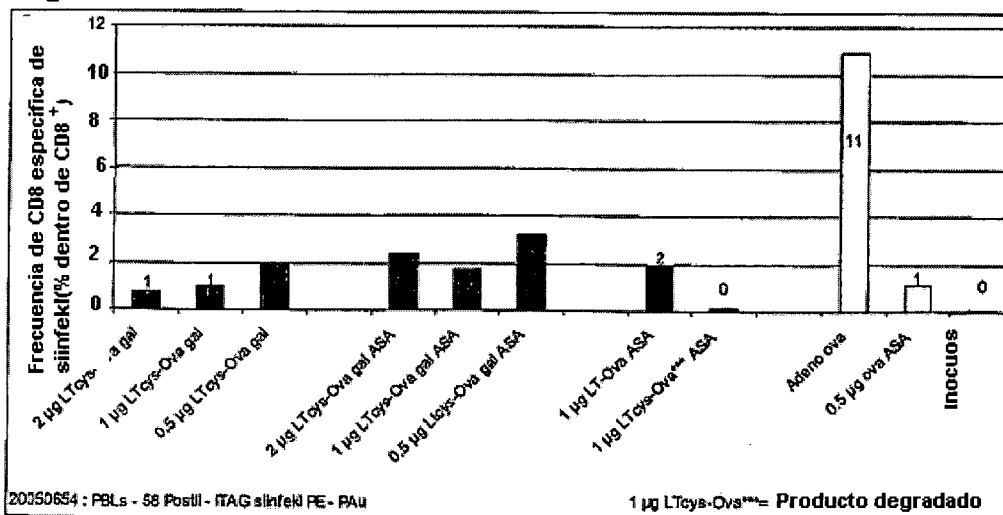


Figura 23

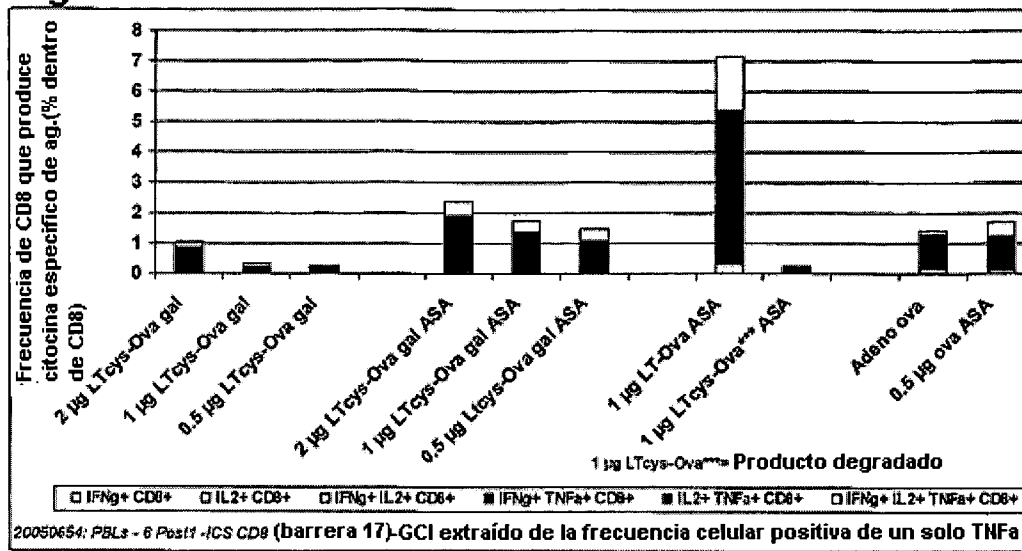


Figura 24

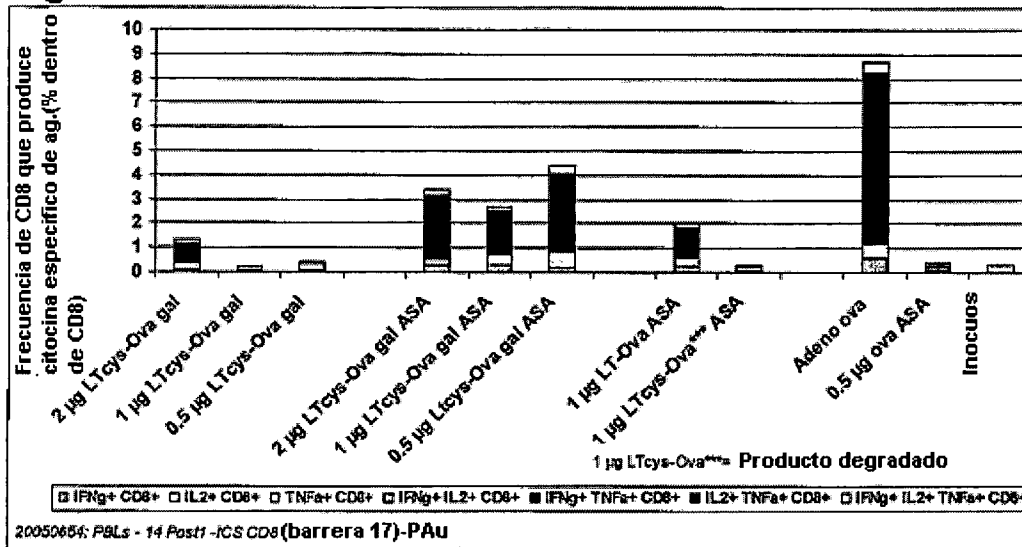


Figura 25

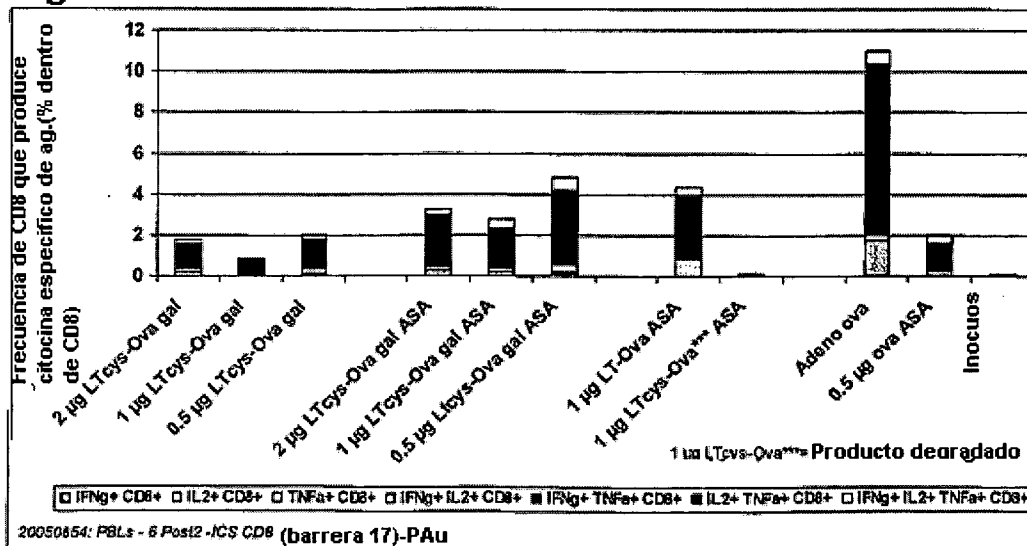


Figura 26

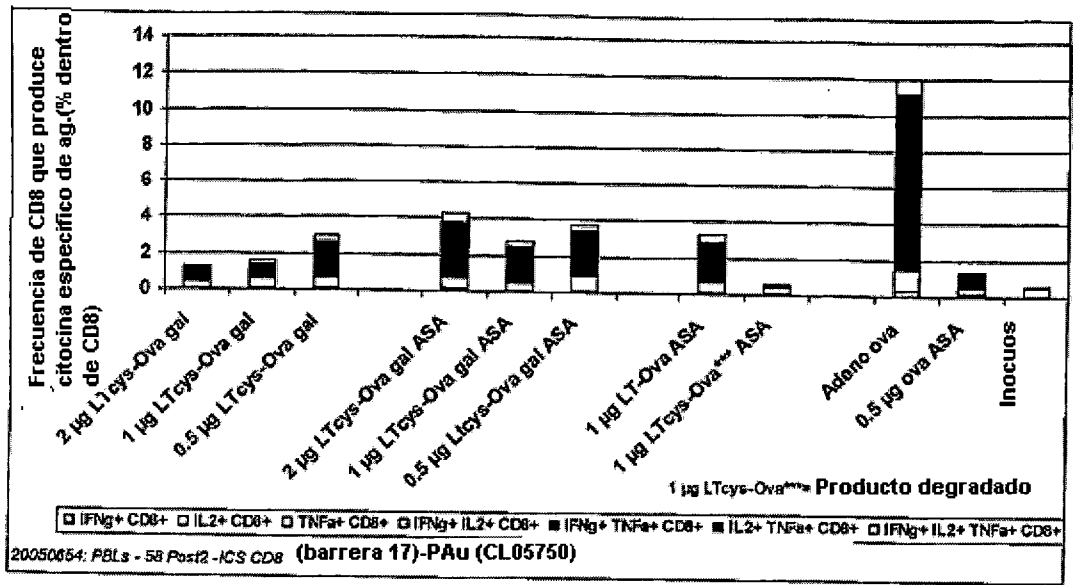


Figura 27

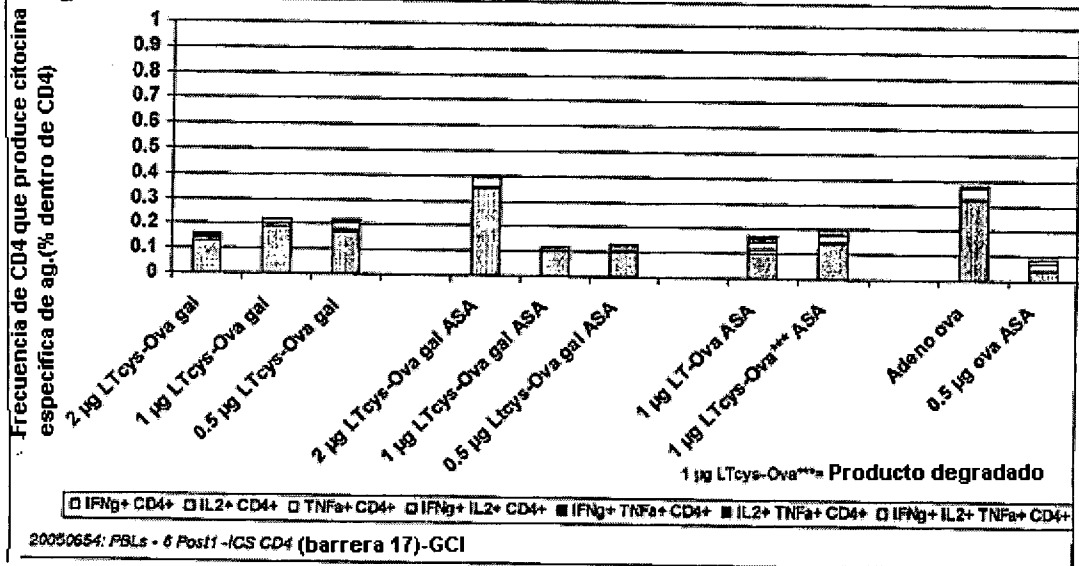


Figura 28

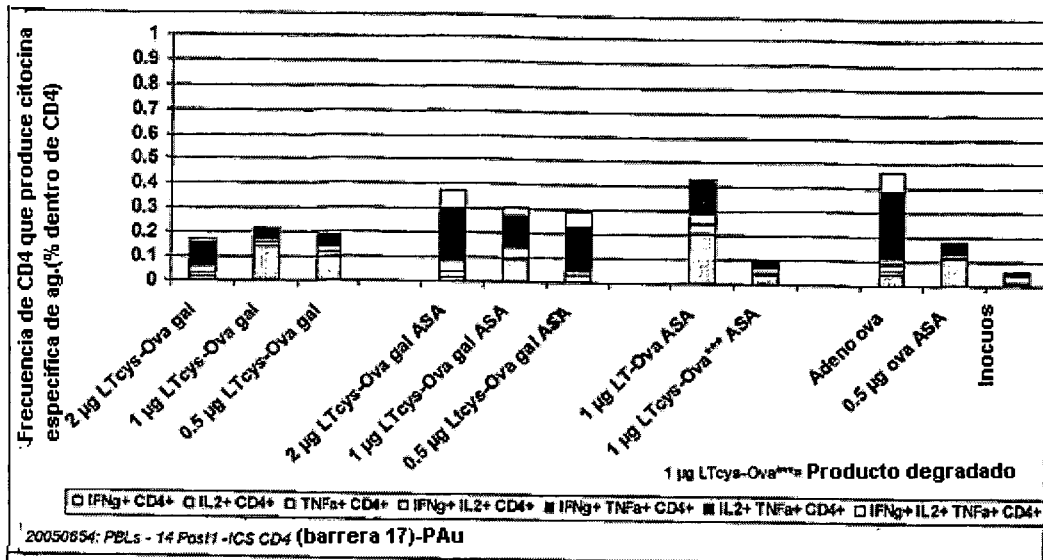


Figura 29

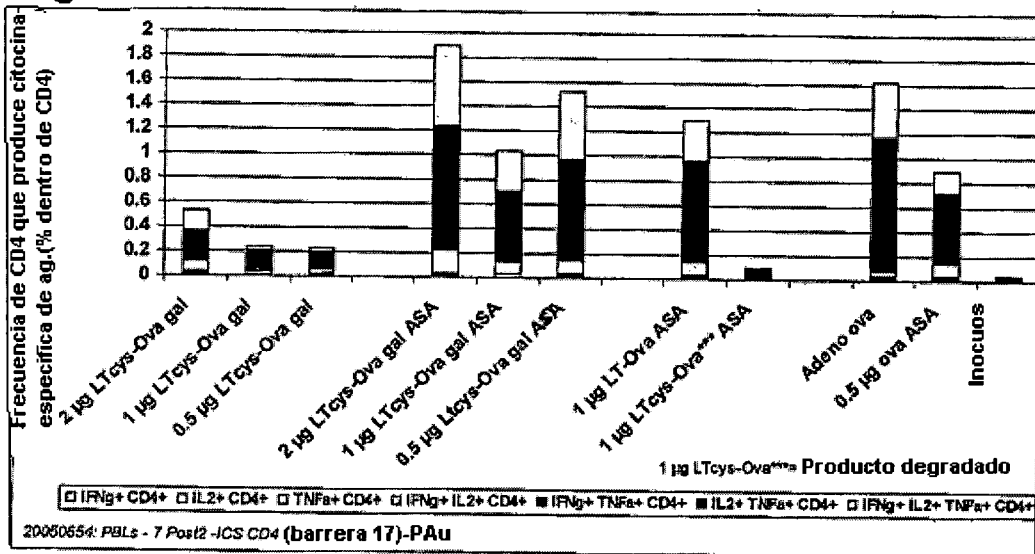


Figura 30

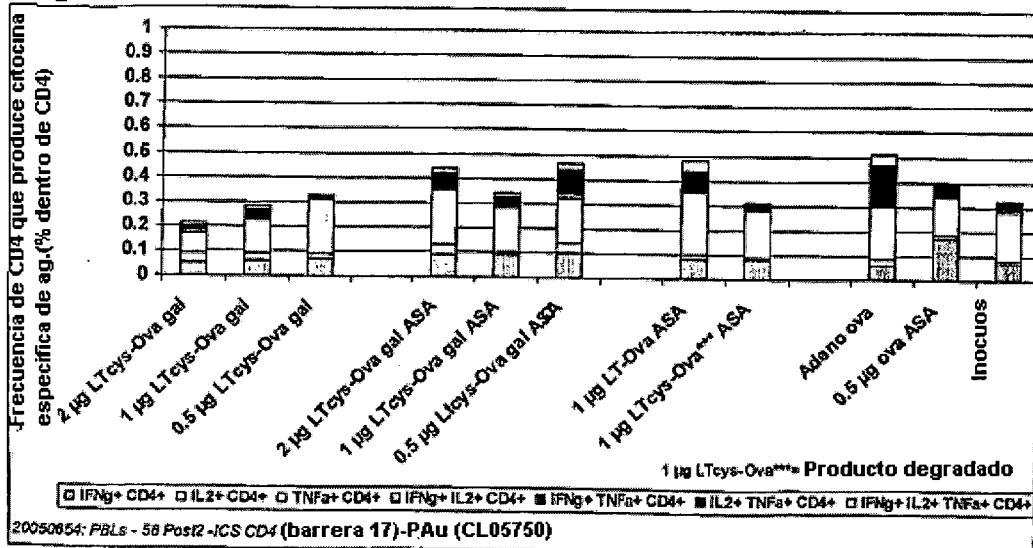


Figura 31

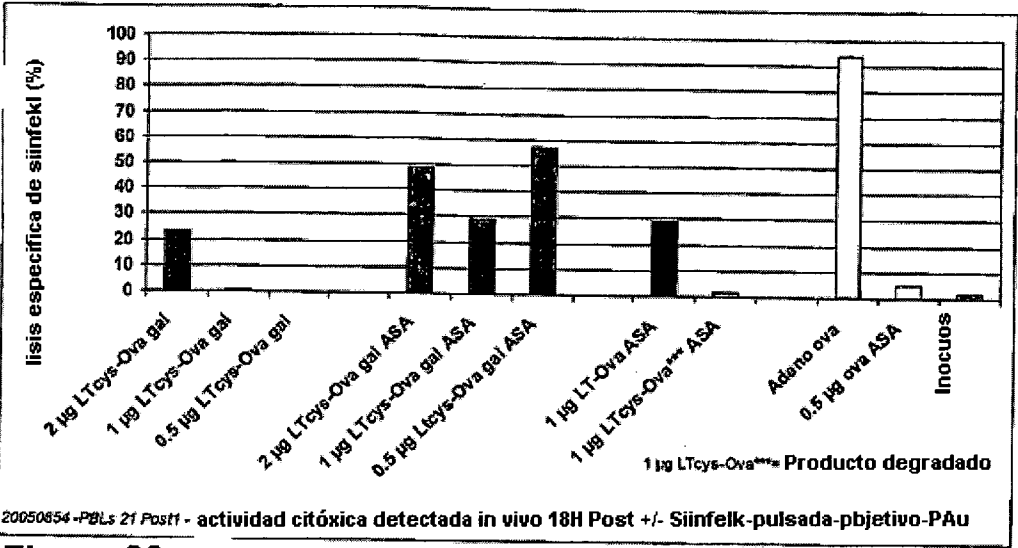


Figura 32

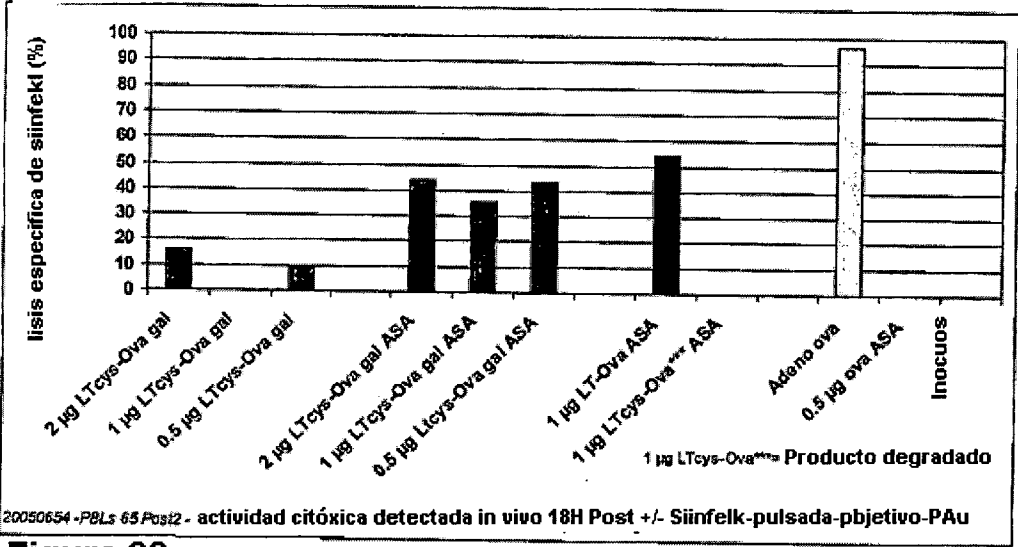


Figura 33

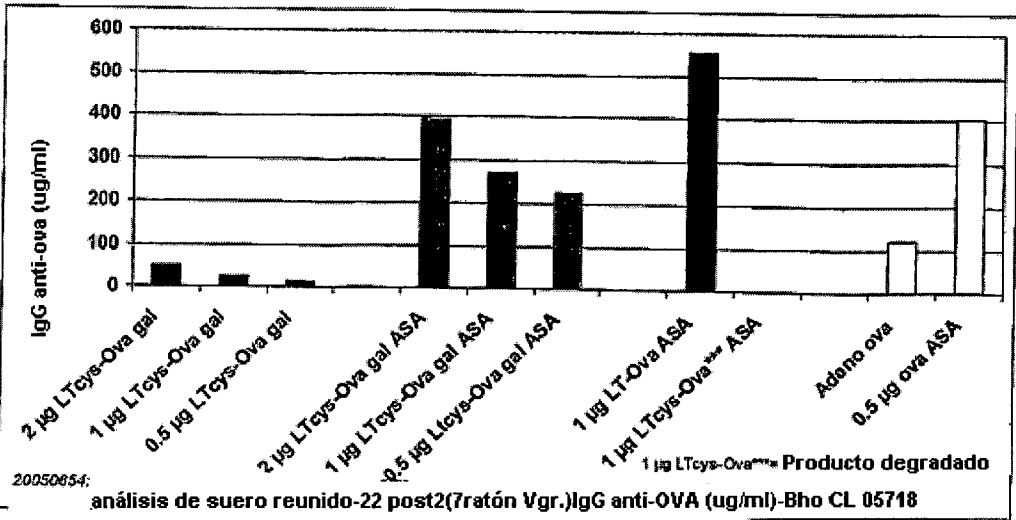


Figura 34

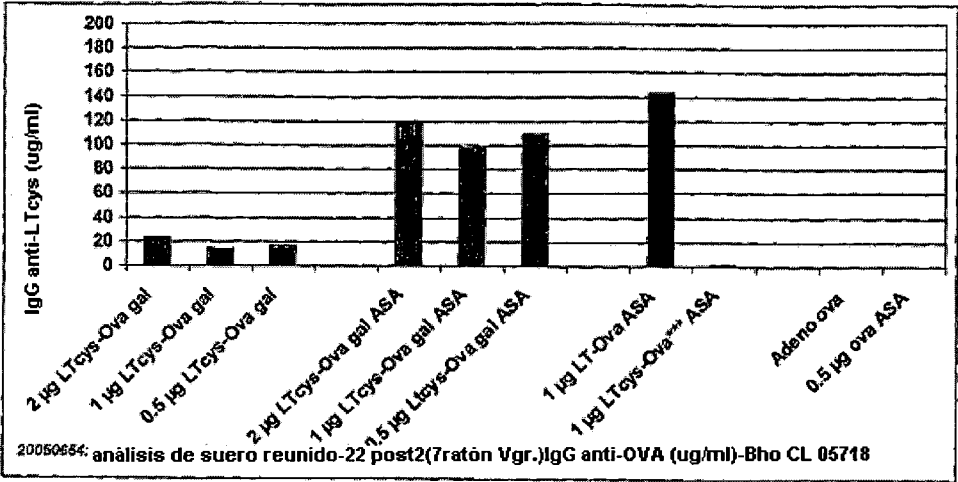
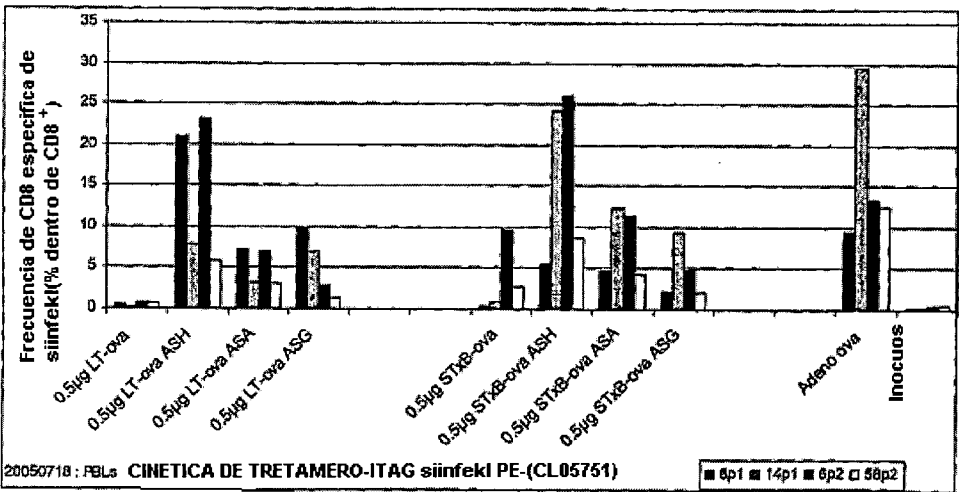


Figura 35



147

Figura 36

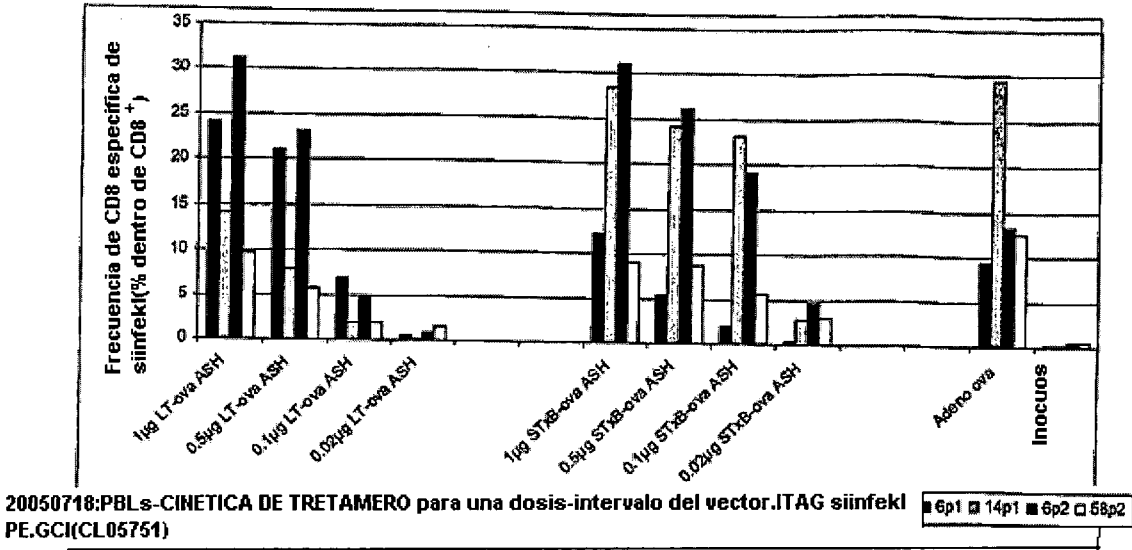


Figura 37

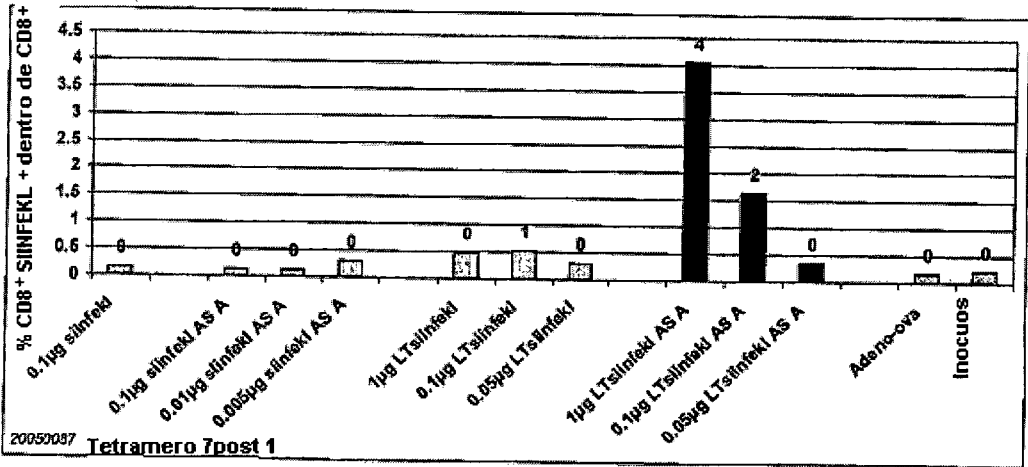


Figura 38

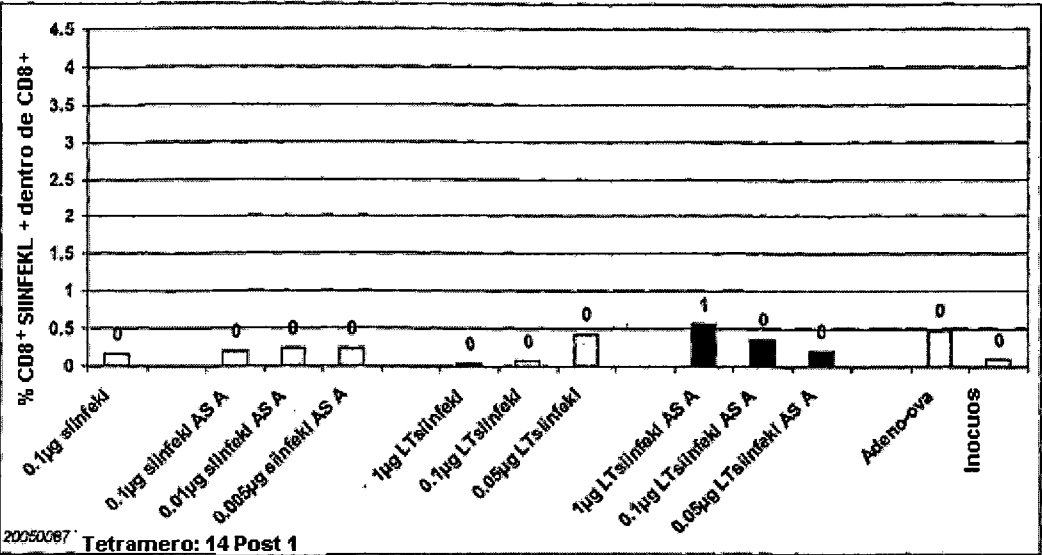


Figura 39

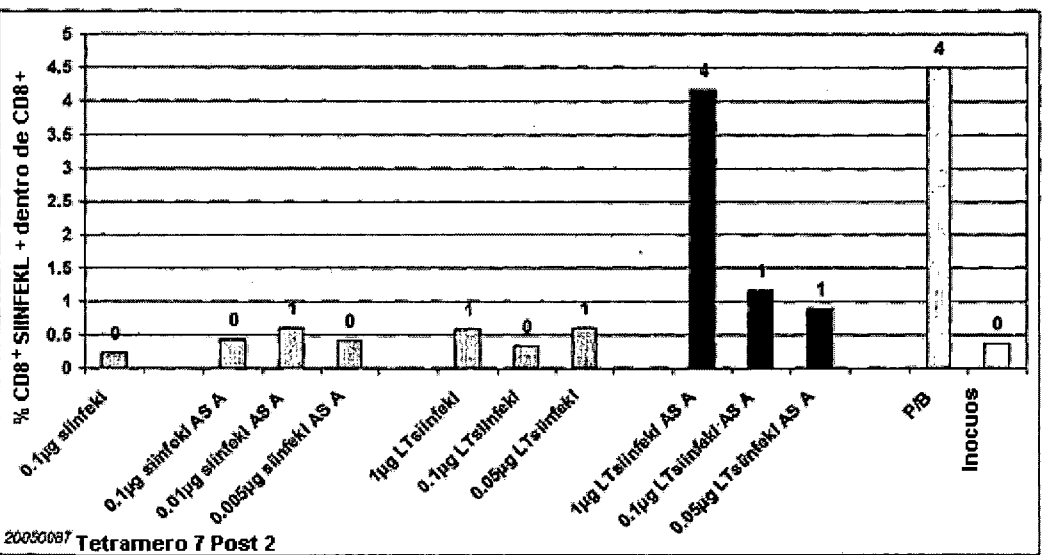


Figura 40

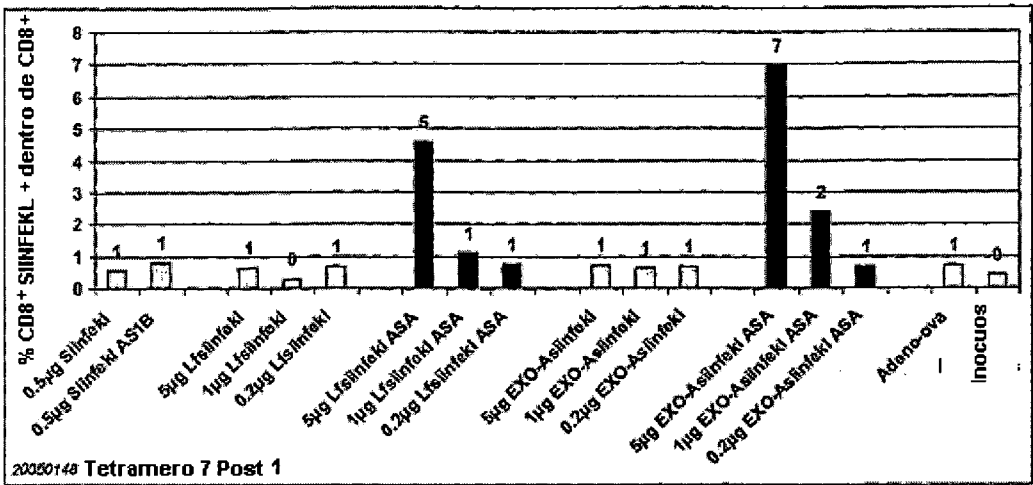
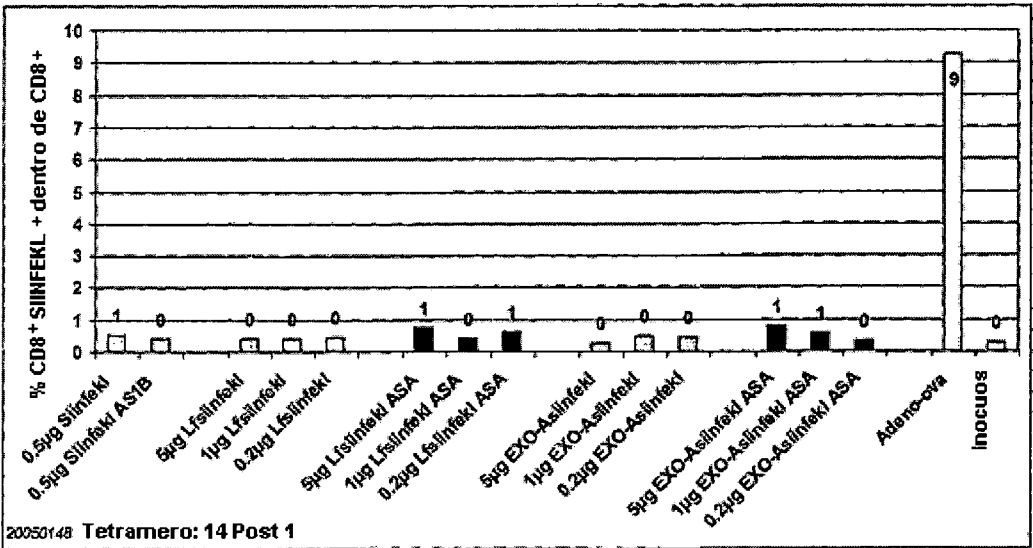


Figura 41



ASD

FIGURA 42

