



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Organización CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N°

07-1367 21

54. TÍTULO

"PROCESO PARA FABRICAR VACUNAS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 39/116; A61P 31/04

71. SOLICITANTE

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

DOMICILIO

RIXENSART, BELGICA

74. REPRESENTANTE LEGAL

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C.

27 DEC 2007

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-136721-00000-0000

Fecha: 2007-12-27 16:15:53 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 107

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

24 ene. 2008

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

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nómbre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

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

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: BIEMANS, Ralph, Leon y DUVIVIER, Pierre.

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

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2006/006270

Fecha: 23/06/06

Publicación Internacional No. WO 2007/000343 A3

Fecha: 04/01/07

⑥

Título (54)

"PROCESO PARA FABRICAR VACUNAS"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/116; A61P 31/04

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

GB

27/06/05

0513069.5

GB

27/06/05

0513071.1

GB

28/07/05

0515556.9

GB

28/11/05

0524204.5

GB

21/12/05

0526040.1

GB

21/12/05

0526041.9

⑨

Comprobante de Pago No. 07-100,735

Fecha: 11 de Diciembre de 2007

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)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☒ Copia del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☒ Traducción del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☐ 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 y publicación con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-136721- -00000-0000

Fecha: 2007-12-27 16:15:53 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 107

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 100,735
FECHA : DICIEMBRE 11 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	72074916	11/12/2007	5,225,000.00

***** 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 : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

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

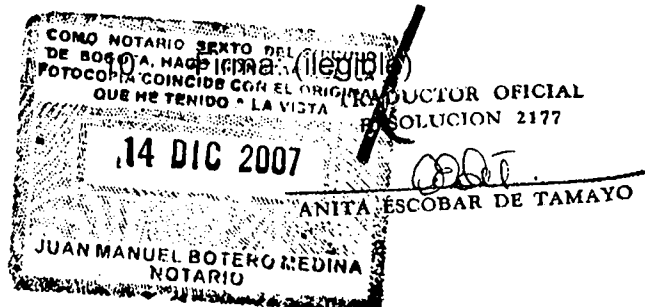
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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:



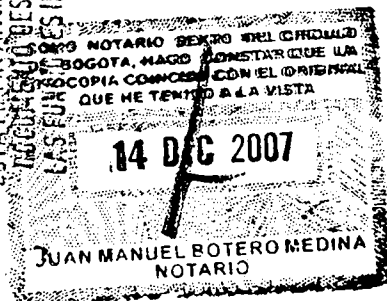
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

260567
Anita Escobar
Cuya firma aparece en el
documento de SEMPENA
LAS FIRMAS INDICADAS



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

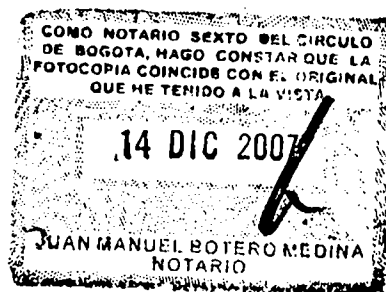
W. Glass
Por el Secretario de Estado

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



iii



1

100

1



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 Keer 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 01 SEP 1964
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: M. G. 2007 SS
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

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

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

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

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

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 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 creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

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

Dado y firmado

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

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

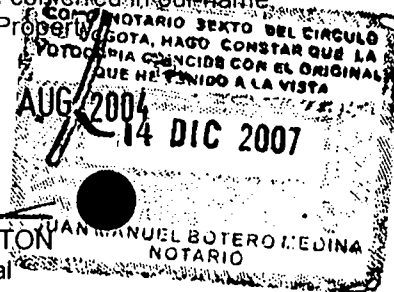
hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial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

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

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

Given and signed this

Marcus Jonathan William DALTON
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.

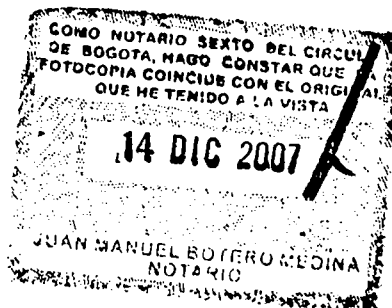
Notary Public (Notario Público).

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 39/116; A61P 31/04	
(22) Fecha de solicitud: 27-12-07		(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0513069.5	27-06-05	GB
	0513071.1	27-06-05	GB
	0515556.9	28-07-05	GB
	0524204.5	28-11-05	GB
	0526040.1	21-12-05	GB
	0526041.9	21-12-05	GB
		(72) Inventor(es): BIEMANS, Ralph, Leon y DUVIVIER, Pierre.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 27-01-08		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 04-01-07
	Fecha de presentación de la solicitud: 23-06-06		N° publicación: WO 2007/000343 A3
	No. de solicitud: PCT/EP2006/006270		
(54) Título:		PROCESO PARA FABRICAR VACUNAS	

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un método para conjugar un sacárido con un portador proteína usando química de condensación por carbodiimida, caracterizado porque el sacárido contiene (por ejemplo como parte de su unidad de repetición), o ha sido derivado para que contenga, grupos amino y/o grupos carboxilo, y caracterizado además porque el portador proteína contiene, o ha sido derivado para que contenga, grupos grupos amino y/o grupos carboxilo, el método comprende los pasos de:

- I) - si el portador proteína contiene tanto grupos amino como grupos carboxilo y el sacárido contiene ya sea grupos amino o grupos carboxilo:
 - a) mezclar el sacárido y la alicuota de carbodiimida requerida para realizar la conjugación, y
 - b) añadir la alicuota de portador proteína requerida durante un periodo de 35 segundos hasta 6 horas;
- II) - si el sacárido contiene tanto grupos amino como grupos carboxilo y el portador proteína contiene ya sea grupos amino o grupos carboxilo:
 - a) mezclar el portador proteína y la alicuota de carbodiimida requerida para realizar la conjugación, y
 - b) añadir la alicuota de sacárido requerida durante un periodo de 35 segundos hasta 6 horas;
- III) - si el sacárido contiene tanto grupos amino como grupos carboxilo y el portador proteína contiene tanto grupos amino como grupos carboxilo:
 - a) mezclar el portador proteína y el sacárido, y
 - b) añadir la alicuota de carbodiimida requerida para realizar la conjugación durante un periodo de 35 segundos hasta 6 horas.

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:
 Aunque las reivindicaciones 47-48 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.
- ☐ 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:

- ☐ 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.

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2006/006270

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO

INV. A61K39/095 A61K39/102 A61K39/116 A61P31/04 C07K17/10

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 C07K C07H

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, WPI Dato, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Dato

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 99/18121 A (CONNAUGHT LAB [US]; RYALL ROBERT P [US]) 15 de Abril de 1999 (1999-04-15) reivindicaciones; ejemplo 3	1-48
X	WO 99/55715 A (GALENICA PHARMACEUTICALS INC [US]; MARCIANI DANTE J [US]) 4 de Noviembre de 1999 (1999-11-04) páginas 36-42; reivindicaciones	44-48

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

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

° Categorías especiales de documentos citados:

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

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

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

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

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

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

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

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

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

30 de Marzo de 2007

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

16/04/2007

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

Hennard, Christophe

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/EP2006/006270

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	CARMENATE TANIA Y COL: "Efecto de la metodología de conjugación sobre la inmunogenicidad y eficacia protectora de conjugados de proteína P64K-polisacárido de meningococcal grupo C" FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 40, no. 3, 9 de Abril de 2004 (2004-04-09), páginas 193-199, XP002314674 ISSN: 0928-8244 página 194, 2.2.1	44-48
A	----- US 5 180 815 A (MASUDA NOBUHITO [JP]) 19 de Enero de 1993 (1993-01-19) columna 12, ejemplos 4-1	1-48
A	----- US 4 376 760 A (JUNG GUENTHER [DE] Y COL) 15 de Marzo de 1983 (1983-03-15) columna 15, ejemplo C -----	1-48

15

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.

PCT/EP2006/006270

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
WO 9918121	A	15-04-1999	AU	9677698 A	27-04-1999
			CA	2305620 A1	15-04-1999
			EP	1019437 A1	19-07-2000
			US	5965714 A	12-10-1999
WO 9955715	A	04-11-1999	AU	760669 B2	22-05-2003
			AU	3767699 A	16-11-1999
			CA	2329897 A1	04-11-1999
			EP	1073667 A2	07-02-2001
			JP	2002513028 T	08-05-2002
US 5180815	A	19-01-1993	NINGUNO		
US 4376760	A	15-03-1983	DE	3040825 A1	09-09-1982
			EP	0051205 A1	12-05-1982
			IL	64157 A	31-12-1984
			JP	57122054 A	29-07-1982

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2006/006270

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 47-48 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/006270

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/095 A61K39/102 A61K39/116 A61P31/04 C07K17/10

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 C07K C07H

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, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/18121 A (CONNAUGHT LAB [US]; RYALL ROBERT P [US]) 15 April 1999 (1999-04-15) claims; example 3 -----	1-48
X	WO 99/55715 A (GALENICA PHARMACEUTICALS INC [US]; MARCIANI DANTE J [US]) 4 November 1999 (1999-11-04) pages 36-42; claims ----- -/--	44-48

☒ 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

30 March 2007

Date of mailing of the international search report

16/04/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hennard, Christophe

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/006270

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CARMENATE TANIA ET AL: "Effect of conjugation methodology on the immunogenicity and protective efficacy of meningococcal group C polysaccharide-P64k protein conjugates" FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 40, no. 3, 9 April 2004 (2004-04-09), pages 193-199, XP002314674 ISSN: 0928-8244 page 194, 2.2.1	44-48
A	US 5 180 815 A (MASUDA NOBUHITO [JP]) 19 January 1993 (1993-01-19) column 12, examples 4-1	1-48
A	US 4 376 760 A (JUNG GUENTHER [DE] ET AL) 15 March 1983 (1983-03-15) column 15, example C	1-48

19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/006270

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9918121	A	15-04-1999	AU 9677698 A CA 2305620 A1 EP 1019437 A1 US 5965714 A	27-04-1999 15-04-1999 19-07-2000 12-10-1999
WO 9955715	A	04-11-1999	AU 760669 B2 AU 3767699 A CA 2329897 A1 EP 1073667 A2 JP 2002513028 T	22-05-2003 16-11-1999 04-11-1999 07-02-2001 08-05-2002
US 5180815	A	19-01-1993	NONE	
US 4376760	A	15-03-1983	DE 3040825 A1 EP 0051205 A1 IL 64157 A JP 57122054 A	09-09-1982 12-05-1982 31-12-1984 29-07-1982

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
4 de Enero de 2007 (04.01.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/000343 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 39/095 (2006.01) **A61P 31/04** (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01) **C07K 17/10** (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)

(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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, 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, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2006/006270

(22) Fecha de Registro Internacional:
23 de Junio de 2006 (23.06.2006)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:

0513069.5 27 de Junio de 2005 (27.06.2005) GB
0513071.1 27 de Junio de 2005 (27.06.2005) GB
0515556.9 28 de Julio de 2005 (28.07.2005) GB
0524204.5 28 de Noviembre de 2005 (28.11.2005) GB
0526040.1 21 de Diciembre de 2005 (21.12.2005) GB
0526041.9 21 de Noviembre de 2005 (21.12.2005) GB

(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))

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** [BE/BE]; Rue De l'Institut 89, B-1300 Rixensart (BE).

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

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): **BIEMANS, Ralph, Leon** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **DUVIVIER, Pierre** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional:

31 de Mayo de 2007

(74) Agente: **LUBIENSKI, Michael, John**; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property CN925.1, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

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: PROCESO PARA FABRICAR VACUNAS

(57) Resumen: La presente solicitud describe un método mejorado para realizar reacciones de conjugación de sacárido-proteína usando química de condensación por carbodiimida. Dependiendo de la naturaleza del sacárido o portador proteína involucrado, la calidad del conjugado puede mejorarse añadiendo lentamente a la mezcla de reacción uno de los componentes de la reacción. También se proporciona composiciones inmunogénicas que contienen los conjugados de sacárido-proteína elaborados mediante los métodos descritos.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 January 2007 (04.01.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/000343 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 39/095 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01) C07K 17/10 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2006/006270

(22) International Filing Date: 23 June 2006 (23.06.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

0513069.5	27 June 2005 (27.06.2005)	GB
0513071.1	27 June 2005 (27.06.2005)	GB
0515556.9	28 July 2005 (28.07.2005)	GB
0524204.5	28 November 2005 (28.11.2005)	GB
0526040.1	21 December 2005 (21.12.2005)	GB
0526041.9	21 December 2005 (21.12.2005)	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).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BIEMANS, Ralph, Leon** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals sa, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **DUVIVIER, Pierre** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals sa, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agent: **LUBIENSKI, Michael, John**; 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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, 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, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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:
31 May 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: PROCESS FOR MANUFACTURING VACCINES

(57) Abstract: The present application discloses an improved method for conducting saccharide-protein conjugation reactions using carbodiimide condensation chemistry. Depending on the nature of the saccharide or protein carrier involved, the quality of the conjugate may be improved by adding one of the reaction components slowly to the reaction mixture. Immunogenic compositions are further provided comprising the saccharide-protein conjugates made by the methods disclosed.

WO 2007/000343 A3

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente MJL/VB62022	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Forma PCT/IPEA/416																									
Solicitud internacional No. PCT/EP2006/006270	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 23.06.2006	Fecha de prioridad (día/mes/año) 27.06.2005																								
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV. A61K39/095																										
Solicitante GlaxoSmithKline Biologicals s.a.																										
1. Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>8</u> hojas, incluyendo esta carátula. 3. Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden: a. ☒ (enviado al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de <u>2</u> hojas, como sigue: ☒ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas). ☐ hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No. I y la Casilla Suplementaria. b. ☐ (enviado únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) , que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).																										
4. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table border="0" style="width: 100%;"><tr><td style="width: 10%;">☒</td><td style="width: 30%;">Casilla No. I</td><td>Bases del reporte</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. II</td><td>Prioridad</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. III</td><td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. IV</td><td>Falta de unidad de invención</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. V</td><td>Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VI</td><td>Ciertos documentos citados</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VII</td><td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VIII</td><td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td></tr></table>			☒	Casilla No. I	Bases del reporte	☐	Casilla No. II	Prioridad	☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial	☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación	☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒	Casilla No. I	Bases del reporte																								
☐	Casilla No. II	Prioridad																								
☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial																								
☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																								
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación																								
☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																								
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																								
☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																								
Fecha de presentación de la demanda 2007-07-04	Fecha de terminación de este reporte 08.10.2007																									
Nombre y dirección de correo de la autoridad examinadora preliminar internacional: Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Funcionario autorizado Hennard, Christophe Teléfono No. +49 89 2399-7355																									

Casilla No. I Bases del reporte

1. Respecto al idioma, este reporte está basado en

☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual fue presentada

☐ una traducción de la solicitud internacional en _____, el cual es el idioma de una traducción
suministrada para los propósitos de:

☐ búsqueda internacional (según las Reglas 12.3(a) y 23.1(b))

☐ publicación de la solicitud internacional (según la Regla 12.4(a))

☐ examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2(a) y/o 55.3(a))

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

Descripción, Páginas

1-31 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, Números

7-42 como se presentaron originalmente

1-6, 43-47 presentadas con el facsímile de 19.09.2007

☐ listado de secuencia y/o alguna tabla(s) - ver Casilla Suplementaria en Relación al Listado de Secuencia

3. ☐ Las modificaciones resultaron en la cancelación de:

☐ la descripción, páginas

☐ las reivindicaciones, Nos.

☐ los dibujos, hojas/figuras

☐ el listado de secuencia *(especificar):*

☐ cualquier tabla(s) relacionada al listado de secuencia *(especificar):*

4. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (alguno de) los anexos modificados a este reporte y numerado antes no ha sido hecho, desde que ellos han sido considerados a través de la presentación original, como esta indicado en la Casilla Suplementaria (Regla 70.2(c)).

☐ la descripción, páginas

☐ las reivindicaciones, Nos.

☐ los dibujos, hojas/figuras

☐ el listado de secuencia *(especificar):*

☐ alguna tabla(s) relacionada al listado de secuencia *(especificar):*

* Si el ítem 4 aplica, algunas o todas de estas hojas pueden ser marcadas "reemplazadas".

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

1. Las preguntas como quiera que la invención reivindicada parezca ser novedosa, involucrar un nivel inventivo (para no ser obvio), o para ser aplicable industrialmente no se han examinado en relación con:

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 47-48

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 47-48 se refieren a la siguiente materia objeto el cual no requiere examen preliminar internacional (*especificar*):

ver hoja separada

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indican elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especificar*):
- ☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa (*especificar*).
- ☐ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional 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) y 13ter.2.
- ☐ 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 hoja separada para detalles adicionales

25

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

1. Afirmación

Novedad (N)	Si:	Reivindicaciones	<u>1-43</u>
	No:	Reivindicaciones	<u>44-47</u>
Nivel Inventivo (IS)	Si:	Reivindicaciones	<u>Ninguna</u>
	No:	Reivindicaciones	<u>1-47</u>
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si:	Reivindicaciones	<u>1-46</u>
	No:	Reivindicaciones	

2. Citaciones y explicaciones (Regla 70.7):

ver hoja separada

Re Ítem III

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

1. Las **reivindicaciones 46-47** de la presente solicitud se relacionan con la materia objeto considerada por esta Autoridad cubierta por las provisiones de la **Regla 67.1(iv) PCT** (método de tratamiento de enfermedades relacionadas con humanos). En consecuencia, no se formulará opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (**Artículo 34(4)(a)(i) PCT**).

Re Ítem V

Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan tal declaración

2. Se hace referencia a los siguientes documentos:
 - D1: WO 99/18121 A
 - D2: WO 99/55715 A
 - D3: FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE B.V., vol. no. 3, Abril 9 de 2004, páginas 193-199,
 - D4: US-A-5 180 815
 - D5: US-A-4 376 760

3. Novedad (Artículo 33(2) PCT)

- 3.1 La reivindicación 44 de la presente solicitud es formulada como una reivindicación de producto-por-proceso relacionada con una composición inmunogénica o vacuna obtenible por el proceso de las reivindicaciones 1-43.

El proceso para obtener el compuesto no hace al producto novedoso per se, y con el fin que un producto reivindicado por la formulación como un producto-por-proceso sea novedoso, se debe demostrar en la solicitud que el producto obtenido es diferente del de la técnica previa. En la página 10 de la descripción, el ejemplo muestra que al añadir la carbodiimida por un período de 10 minutos, la relación TT/PS del producto obtenido es diferente de la relación obtenida cuando la carbodiimida se agrega de una vez. Sin embargo, en la página 24, condiciones de conjugación diferentes producen radio TT/PS diferente aunque se usan los mismos reactivos y cantidades. Así, la solicitud falla en establecer que el producto obtenido por el método es de hecho diferente de la técnica previa. Persisten dudas adicionales considerando la revelación que muestra que diferentes parámetros influyen el producto obtenido en términos de solo relación TT/PS, así, es posible obtener, mediante el método de la presente reivindicación 1, conjugados que corresponden a los obtenidos agregando la carbodiimida de una vez, pero al influenciar otros parámetros del método y simultáneamente agregar la carbodiimida por un período de tiempo mayor. Por lo tanto, debido a que las reivindicaciones de producto-por-proceso no son claras en cuanto a cuales compuestos caen bajo la reivindicación, el producto obtenible mediante dicha reivindicación no se distingue de los compuestos revelados en la técnica previa y la novedad de estos productos no puede reconocerse si los documentos de la técnica previa revelan compuestos que tienen los mismos elementos estructurales a los de la reivindicación.

Así, se considera que cualquier conjugado de sacárido-vehículo de proteína o composición inmunogénica que lo comprende, en la cual el conjugado está caracterizado por la formación de un enlace de amida que une el vehículo de proteína y el sacárido, anticipa la materia objeto reivindicada de la reivindicación 44.

Con el fin de ilustrar esta objeción, D1 (reivindicaciones; ejemplo 3) describe un conjugado de vacuna de un polisacárido serotipo 19F con un vehículo de proteína mediante acoplamiento de carbodiimida generando así un enlace de amida. Tal conjugado se usa en la preparación de un medicamento y se reivindica en un método de tratamiento. Así, a la luz de este documento, las reivindicaciones 44-47 de la presente solicitud no son novedosas.

Igualmente, D2 (páginas 36-42; reivindicaciones) y D3 (página 194, 2.2.1) revela la preparación de un conjugado de vehículo de proteína - sacárido usando carbodiimida como agente de conjugación. Estos documentos también anticipan las reivindicaciones 44-47 de la presente solicitud.

Se considera que proveer una lista exhaustiva de documentos que revelan tales conjugados no es necesaria para ilustrar adicionalmente la falta de novedad de estas reivindicaciones, que por lo tanto, no cumplen los requerimientos del Artículo 33(2) PCT.

- 3.2 La reivindicación 1 de la presente solicitud se relaciona con un método para conjugar un sacárido a un vehículo de proteína usando una carbodiimida y caracterizado porque uno de los reactivos (dependiendo de la aparición de los grupos amino y carboxilo en el sacárido, la proteína o ambos) se adiciona a la mezcla de reacción por un período de 35 segundos a 6 horas.

Como nada en la técnica previa citada revela esta característica, se considera que la reivindicación 1, así como las reivindicaciones 2-43 dependientes son novedosas y cumplen los requerimientos del Artículo 33(2)PCT.

4. Nivel Inventivo (Artículo 33(3) PCT)

D1 (pasajes ver anteriormente), que es la técnica previa más cercana, describe la preparación de conjugados de sacárido-vehículo de proteína usando reactivo de acoplamiento de carbodiimida para la preparación de una composición inmunogénica o vacuna.

El método de la reivindicación 1 presente se distingue en sí de D1 en que la reacción de acoplamiento se realiza agregando una de las mitades para reaccionar, o la carbodiimida por un período de 35 segundos a 6 horas.

El efecto técnico logrado por esta característica distinguible es, como se mencionó en la solicitud en la página 3, líneas 16-21, un mayor rendimiento del conjugado de sacárido, mejor filtrabilidad, mejor control de la conjugación, y se evitan las reticulaciones intra-mitades. Así, el problema a ser resuelto por la presente reivindicación 1 puede verse como proveer un método para preparar conjugados de sacárido-vehículo de proteína, que tienen las ventajas anteriores.

Considerando la formación del conjugado, por la reacción de un grupo amino con un ácido carboxílico en la presencia de una carbodiimida, se logra la formación de un enlace de amida. El experto que realiza tal reacción sabe que, si una de las mitades portan al grupo amino y el carboxilo, se espera una reacción intramolecular o intermolecular con la misma mitad (formación de derivados cíclicos o dímeros). Más aún, el experto sabe que, con el fin de minimizar estas "reacciones secundarias", la mitad que porta ambos grupos se debe agregar lentamente (por un tiempo mayor) a la mezcla de reacción y entrar en contacto con el reactivo (carbodiimida) en una etapa muy tardía. Al hacer esto, el experto sabe que, cuando la mitad que porta ambos grupos entra en contacto con la segunda mitad, el último estará presente en la mezcla en un gran exceso aumentando así la probabilidad de reacción de las dos mitades juntas en lugar de reaccionar intramolecularmente. Todos los efectos mencionados anteriormente están directamente relacionados con esta propiedad al usar mitades que portan ambos grupos.

A pesar que el experto pensaría en un gran número de parámetros a alterar con el fin de ver un efecto, el experto (que puede estar representado por un equipo de expertos compuesto de un especialista en inmunología quien identifica el problema: aumentar la relación TT/PS, y un químico especializado en acoplamiento de proteína/sacárido, que reconocen el problema surgido por la reacción intramolecular del sacárido y/o la proteína) consideraría el tiempo de adición de la carbodiimida como una alteración posible al método de tiempo largo conocido en la técnica para mejorar el acoplamiento intermolecular. Más aún, este equipo predeciría con gran certeza que el resultado de esta diferencia demostraría tener mayor acoplamiento intermolecular.

Con el fin de ilustrar el conocimiento general del experto químico, D4 (columna 4, ejemplos 4-1) y D5 (columna 15, Ejemplo C) revelan ambos la adición por gotas de un reactivo en una solución cuando una de las mitades porta los dos grupos, limitando por consiguiente el riesgo de reticulación (no se pretende que la enseñanza de estos documentos sea combinada con D1, pero sirve a los propósitos de ilustrar el conocimiento del experto a cargo de la reacción de un sacárido con un vehículo de proteína en el cual una o ambas entidades portan simultáneamente un grupo amino y un carboxilo no destinado a reticularse).

Por lo tanto, a pesar de la técnica previa, agregar la carbodiimida de una vez en la mezcla de reacción para preparar un conjugado de proteína-sacárido por varios años, y a pesar que el experto sabe que varios parámetros regulan la relación de TT/PS, el experto actuaría, con alta expectativa de éxito, en el tiempo de adición de la carbodiimida con el fin de aumentar la reacción intermolecular y así aumentar la inmunogenicidad del conjugado. Así, la solución proporcionada por la presente reivindicación 1 no involucra un nivel inventivo.

Las reivindicaciones dependientes 2-43 de la presente solicitud no introducen ninguna característica susceptible de un nivel inventivo porque ya están reveladas en D1 o parten del conocimiento general del experto, y por ende se consideran como una desviación estándar de la técnica.

Se concluye que, las reivindicaciones 1-43 de la presente solicitud no cumplen los requerimientos del Artículo 33(3)PCT.

5. **Aplicabilidad Industrial (Artículo 33(4) PCT):**

Debido a la naturaleza de las reivindicaciones, una aplicabilidad industrial de la invención es obvia y se considera que las reivindicaciones 1-46 de la presente solicitud cumplen los requerimientos del Artículo 33(4) PCT.

Para la evaluación de las reivindicaciones 47-48 presentes sobre la pregunta si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en el PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero pueden permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

6. La dependencia de las reivindicaciones 45-47 parece ser incorrecta y parecen ser el resultado de un olvido obvio (Artículo 6 PCT).

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Un método para preparar una composición inmunogénica que comprende conjugar un sacárido a un vehículo de proteína usando química de condensación de carbodiimida, en donde el sacárido comprende (por ejemplo como parte de su unidad de repetición), o ha sido derivado para comprender, grupos amino y/o carboxilo, y en donde el vehículo de proteína comprende, o ha sido derivado para comprender, grupos amino y/o carboxilo, que comprende las etapas de:
 - I) - Si el vehículo de proteína comprende grupos amino y carboxilo y el sacárido comprende cualquier grupo amino o carboxilo:
 - a) mezclar el sacárido y alícuota de carbodiimida requerida para realizar la conjugación, y
 - b) agregar la alícuota de vehículo de proteína requerida por un período de 35 segundos a 6 horas;
 - II) - Si el sacárido comprende grupos amino y carboxilo y el vehículo de proteína comprende cualquier grupo amino o carboxilo:
 - a) mezclar el vehículo de proteína y alícuota de carbodiimida requerida para realizar la conjugación, y
 - b) agregar la alícuota de sacárido requerida por un período de 35 segundos a 6 horas;
 - III) - Si el sacárido comprende grupos amino y carboxilo y el vehículo de proteína comprende grupos amino y carboxilo:
 - a) mezclar el vehículo de proteína y el sacárido, y
 - b) agregar la alícuota de carbodiimida requerida para realizar la conjugación por un período de 35 segundos a 6 horas.
2. El método de la reivindicación 1, en donde en la etapa b), el período es de 50 segundos a 5 horas, 1 minuto a 4 horas, 2 minutos a 3 horas, 3 minutos a 2 horas, 4 a 60 minutos, 5 a 50 minutos, 6 a 40 minutos, 7 a 30 minutos u 8 a 20 minutos.
3. El método de la reivindicación 1, en donde en la etapa b) , el período es de 1 minuto a 5 horas, 10 minutos a 4 horas, 20 minutos a 3 horas, 30 minutos a 2 horas, 40 a 90 minutos, o 50 a 70 minutos.
4. El método de las reivindicaciones 1-3, en donde la carbodiimida es EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida) o una carbodiimida diferente de EDAC.
5. El método de las reivindicaciones 1-4, en donde la alícuota de carbodiimida requerida para realizar la conjugación es 0.01 a 3, 0.05 a 2 o 0.09 a 1 mg/mg de sacárido.
6. El método de las reivindicaciones 1-5, en donde el sacárido y/o vehículo de proteína ha sido derivado para comprender grupos amino o carboxilo.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

43. El método de las reivindicaciones 1-42, en donde el vehículo de proteína se selecciona del grupo que consiste de: TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, proteína D de H, influenazar, PhtD neumocócica, y Neumolisina neumocócica.
44. Una composición inmunogénica o vacuna obtenible por el método de las reivindicaciones 1-43.
45. Uso de una composición inmunogénica o vacuna de la reivindicación 45 en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedad.
46. Método de prevención o tratamiento de enfermedad que comprende la etapa de administrar una dosis efectiva de la composición inmunogénica o vacuna de la reivindicación 45 a un paciente en necesidad de la misma.
47. El uso o método de la reivindicación 46 o 47, en donde la enfermedad es causada por una bacteria seleccionada de una lista que consiste de: *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *Streptococcus Grupo B*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* y *H. influenzae*.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference MJLVB62022	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA416
International application No. PCT/EP2006/006270	International filing date (day/month/year) 23.06.2006	Priority date (day/month/year) 27.06.2005	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K39/095			
Applicant GlaxoSmithKline Biologicals s.a.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ <i>sent to the applicant and to the International Bureau</i> a total of 2 sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ <i>(sent to the International Bureau only)</i> a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 2007-07-04		Date of completion of this report 08.10.2007	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Hennard, Christophe Telephone No. +49 89 2399-7355 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2006/006270

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-31 as originally filed

Claims, Numbers

7-42 as originally filed

1-6, 43-47 filed with telefax on 19.09.2007

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

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

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2006/006270

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

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

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 47-48

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 47-48 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

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

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

☐ no international search report has been established for the 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 Preliminary Examining 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 Preliminary Examining 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 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.

☐ 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 Preliminary Examining 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 separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2006/006270

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-43</u>
	No: Claims	<u>44-47</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>None</u>
	No: Claims	<u>1-47</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-46</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Re Item III

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

1. **Claims 46-47** of the present application relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of **Rule 67.1(iv) PCT** (method of treatment of humans related disease). 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 V

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

2. Reference is made to the following documents:
D1: WO 99/18121 A
D2: WO 99/55715 A
D3: FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE B.V., vol. 40, no. 3, 9 April 2004, pages 193-199,
D4: US-A-5 180 815
D5: US-A-4 376 760
3. **Novelty (Article 33(2) PCT):**
 - 3.1 Claim 44 of the present application is formulated as product-by-process claim related to an immunogenic composition or vaccine obtainable by the process of claims 1-43.
The process for obtaining the compound does not render the product novel per se, and in order for a product claimed by the formulation as a product-by-process to be novel, it must be demonstrate in the application that the product obtained is different from the prior art. On page 10 of the specifications, the example shows that when adding the carbodiimide over a period of 10 minutes, the TT/PS ratio of the product obtained is different from the ratio obtained when the carbodiimide is added at once. However, on page 24, different conjugation conditions result in different TT/PS ratio whilst using the same reagents and amounts. Thus, the application fails to establish that the product obtained by the method is indeed different from the prior art. Further doubts subsists considering the disclosure which shows that different parameters influence the

product obtained in terms of TT/PS ratio alone, thus, it is possible to obtain by the method of present claim 1 conjugates corresponding to those obtained by adding the carbodiimide at once but by influencing on other parameters of the method and simultaneously adding the carbodiimide over a longer period of time. Therefore, because product-by-process claims are unclear as to which compounds are falling under the claim, the product obtainable by such claim are not distinguishable from the compounds disclosed in the prior art and the novelty of these products cannot be recognised should prior art documents disclose compounds having the same structural elements as those of the claim. Thus, any saccharide-protein carrier conjugate or immunogenic composition comprising it in which the conjugate is characterised by the formation of an amide bond linking the protein carrier and the saccharide is considered to anticipate the claimed subject matter of claim 44.

In order to illustrate this objection, D1 (claims; example 3) describes a vaccine conjugate of a polysaccharide serotype 19F with a protein carrier via carbodiimide coupling thereby generating an amide bond. Such conjugate is used in the preparation of a medicament and claimed in a method of treatment. Thus, in the light of this document, claims 44-47 of the present application are not novel.

In a similar way, D2 (pages 36-42; claims) and D3 (page 194, 2.2.1) disclose the preparation of a protein carrier - saccharide conjugate using carbodiimide as conjugating agent. These documents are also anticipating claims 44-47 of the present application.

Providing a comprehensive list of documents disclosing such conjugates is considered as not necessary to further illustrate the lack of novelty of these claims which therefore do not fulfil the requirements of Article 33(2) PCT.

- 3.2 Claim 1 of the present application concerns a method for conjugating a saccharide to a protein carrier using a carbodiimide and characterised in that one of the reagent (depending on the occurrence of both amino and carboxyl groups on the saccharide, the protein or both) is added to the reaction mixture over a period of 35 seconds to 6 hours.

Because none of the cited prior art discloses this feature, claim 1 as well as dependent claims 2-43 are considered novel and fulfil the requirements of Article 33(2) PCT.

4. Inventive merit (Article 33(3) PCT):

D1 (passages see above), which is the closest prior art, describes the preparation of

saccharide-protein carrier conjugates using carbodiimide coupling reagent for the preparation of an immunogenic composition or vaccine.

The method of present claim 1 distinguishes itself from D1 in that the coupling reaction is performed by adding one of the moieties to react or the carbodiimide over a period of 35 seconds to 6 hours.

The technical effect achieved by this distinguishing feature is, as mentioned in the application of page 3, lines 16-21, a higher yield in saccharide conjugate, better filterability, better control of the conjugation, and preventing intra-moiety cross-links. Thus, the problem to be solved by the present claim 1 can be seen in providing a method of preparing saccharide-protein carrier conjugates having the above advantages.

Considering the conjugate formation, by reacting an amino group with a carboxylic acid in the presence of a carbodiimide, formation of an amide bond is achieved. The skilled person performing such a reaction knows that, should one of the moiety carry both the amino and the carboxyl group intramolecular reaction or intermolecular reaction with the same moiety (formation of cyclic or dimer derivatives) is to be expected. Moreover, the skilled person also knows that, in order to minimise these "side reactions", the moiety bearing both groups must be added slowly (over a longer time) to the reaction mixture and come in contact with the reactive (carbodiimide) at a very late stage. By doing so, the skilled person knows that, when the moiety bearing both groups come in contact with the second moiety, the latter will be present in the mixture in large excess thereby increasing the probability of reacting the two moieties together instead of reacting intramolecularly. All the effects mentioned above, are directly linked to this property when using moieties carrying both groups.

In spite of that the skilled person would think of a large number of parameters to alter in order to see an effect, the skilled person (which can be represented by a team of skilled persons made of a specialist in immunology which identifies the problem: increasing the TT/PS ratio and a chemist specialised in protein/saccharide coupling recognising the problem posed by intramolecular reaction of the saccharide and/or the protein) would consider the time of addition of the carbodiimide as one possible alteration to the long time known method in the art for improving the intermolecular coupling. Moreover, this team would predict with high certainty that the result of this difference will demonstrate to have higher intermolecular coupling.

In order to illustrate the general knowledge of the chemist skilled person, D4 (column 12, examples 4-1) and D5 (column 15, example C) both disclose the dropwise addition of a reagent in a solution when one of the moieties carries the two groups therefore limiting the risk of cross-reaction (the teaching of these documents is not

intended to be combined with D1 but serves the purpose of illustrating the knowledge of the skilled person in charge of reacting a saccharide with a protein carrier in which one or both of the entities carry simultaneously an amino and carboxyl group not intended to cross-react).

Therefore, in spite of the prior art adding the carbodiimide at once in the reaction mixture for preparing a protein-saccharide conjugate since many years, and in spite of the skilled person knowing that several parameters regulate the TT/PS ratio, the skilled person would, with high expectation of success act on the time of addition of the carbodiimide in order to increase the intermolecular reaction and thus increasing the immunogenicity of the conjugate. Thus, the solution provided by the present claim 1 does not involve an inventive merit.

The dependent claims 2-43 of the present application do not introduce any feature susceptible of an inventive merit because they are either disclosed in D1 or part of the general knowledge of the skilled person and thus are considered as standard deviation in the art.

It is concluded that, claims 1-43 of the present application do not fulfil the requirements of Article 33(3) PCT.

5. Industrial applicability (Article 33(4) PCT):

Due to the nature of the claims, an industrial applicability of the invention is obvious and **claims 1-46** of the present application are considered to fulfil the requirements of **Article 33(4) PCT**.

For the assessment of the present **claims 47-48** 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 the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

6. The dependency of claims 45-47 appear to be incorrect and seem to result from an obvious forgetting (Article 6 PCT).

1. A method of making an immunogenic composition comprising conjugating a saccharide to a protein carrier using carbodiimide condensation chemistry, wherein the saccharide comprises (for instance as part of its repeating unit), or has been derivatised to comprise, amino and/or carboxyl groups, and wherein the protein carrier comprises, or has been derivatised to comprise, amino and/or carboxyl groups, comprising the steps of:
 - I) - if the protein carrier comprises both amino and carboxyl groups and the saccharide comprises either amino or carboxyl groups:
 - a) mixing the saccharide and aliquot of carbodiimide required to perform the conjugation, and
 - b) adding the aliquot of protein carrier required over a period of 35 seconds to 6 hours;
 - II) - if the saccharide comprises both amino and carboxyl groups and the protein carrier comprises either amino or carboxyl groups:
 - a) mixing the protein carrier and aliquot of carbodiimide required to perform the conjugation, and
 - b) adding the aliquot of saccharide required over a period of 35 seconds to 6 hours;
 - III) - if the saccharide comprises both amino and carboxyl groups and the protein carrier comprises both amino and carboxyl groups:
 - a) mixing the protein carrier and saccharide, and
 - b) adding the aliquot of carbodiimide required to perform the conjugation over a period of 35 seconds to 6 hours.
2. The method of claim 1, wherein in step b) the period is 50 seconds to 5 hours, 1 minute to 4 hours, 2 minutes to 3 hours, 3 minutes to 2 hours, 4 to 60 minutes, 5 to 50 minutes, 6 to 40 minutes, 7 to 30 minutes or 8 to 20 minutes.
3. The method of claim 1, wherein in step b) the period is 1 minute to 5 hours, 10 minutes to 4 hours, 20 minutes to 3 hours, 30 minutes to 2 hours, 40 to 90 minutes, or 50 to 70 minutes.
4. The method of claims 1-3, wherein the carbodiimide is EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide) or a carbodiimide other than EDAC.
5. The method of claims 1-4, wherein the aliquot of carbodiimide required to perform the conjugation is 0.01 to 3, 0.05 to 2 or 0.09 to 1 mg/mg saccharide.
6. The method of claims 1-5, wherein the saccharide and/or protein carrier has been derivatised to comprise amino or carboxyl groups.

43. The method of claims 1-42, wherein the protein carrier is selected from the group consisting of: TT, DT, CRM197, fragment C of TT, protein D of *H. influenzae*, pneumococcal PhtD, and pneumococcal Pneumolysin.
44. An immunogenic composition or vaccine obtainable by the method of claims 1-43.
45. Use of the immunogenic composition or vaccine of claim 45 in the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of disease.
46. Method of preventing or treating disease comprising the step of administering an effective dose of the immunogenic composition or vaccine of claim 45 to a patient in need thereof.
47. The use or method of claim 46 or 47, wherein the disease is caused by a bacterium selected from a list consisting of: *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *M. catarrhalis*, Group B *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, and *H. influenzae*.

PROCESO PARA FABRICAR VACUNAS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 La presente solicitud describe un método mejorado para
realizar reacciones de conjugación de sacárido-proteína usando
química de condensación por carbodiimida. Dependiendo de la
naturaleza del sacárido o portador proteína involucrado, la calidad
del conjugado puede mejorarse añadiendo lentamente a la mezcla de
10 reacción uno de los componentes de la reacción. También se
proporciona composiciones inmunogénicas que contienen los
conjugados de sacárido-proteína elaborados mediante los métodos
descritos.

15

PROCESO PARA FABRICAR VACUNAS

La presente invención se refiere a métodos mejorados para realizar reacciones de condensación por carbodiimida. En particular, se refiere a la conjugación de sacáridos y proteínas usando condensación por carbodiimida. También se refiere a composiciones inmunogénicas que se pueden elaborar para que contengan el conjugado sacárido-proteínas de la invención.

El uso de polisacáridos capsulares bacterianos ha sido aplicado ampliamente en inmunología durante muchos años para la prevención de enfermedades bacterianas. Un problema con este uso, sin embargo, es la naturaleza independiente de T de la respuesta inmunitaria. Estos antígenos por lo tanto son poco inmunógenos en los niños pequeños. Este problema ha sido superado conjugando los antígenos polisacáridos con un portador proteína (una fuente de epítomos T auxiliares) los cuales se pueden usar entonces para producir una respuesta inmunitaria dependiente de T, aún en el primer año de vida.

En la materia se conocen diversas técnicas de conjugación. los conjugados se pueden preparar mediante métodos de aminación reductiva directa según se describe en US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). Otros métodos se describen en EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508. El método de conjugación alternativamente se puede apoyar en activación de grupos hidroxilo del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio

(CDAP) para formar un éster cianato. El sacárido activado puede ser acoplado de esta forma directamente o por medio de un grupo separador (enlazante) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el éster cianato puede ser acoplado con hexano

5 diamina o dihidrazida de ácido adípico (ADH o AH) y el sacárido derivado de amino se conjuga con la proteína portadora usando usando química con carbodiimida (por ejemplo EDAC o EDC) por medio de un grupo carboxilo en el portador proteína. Estos conjugados están descritos en la solicitud del TCP publicada WO

10 93/15760 Uniformed Services University y WO 95/08348 y WO 96/29094. Véase también Chu C. et al. Infect. Immunity, 1983 245 256.

En general los siguientes tipos de grupos químicos en un portador proteína se pueden usar para acoplamiento / conjugación:

15 A) Carboxilo (por ejemplo por medio de ácido aspártico o ácido glutámico) el cual puede estar conjugado con grupos amino naturales o derivados en porciones sacárido usando química con carbodiimida;

B) Grupo amino (por ejemplo por medio de lisina) el cual puede estar conjugado con grupos carboxilo naturales o derivados en

20 porciones sacárido usando química con carbodiimida;

C) Sulfhidrilo (por ejemplo por medio de cisteína);

D) Grupo hidroxilo (por ejemplo por medio de tirosina);

E) Grupo imidazolilo (por ejemplo por medio de histidina);

F) Grupo guanidilo (por ejemplo por medio de arginina); y

25 G) Grupo indolilo (por ejemplo por medio de triptófano).

En un sacárido, en general los siguientes grupos se pueden usar para un acoplamiento: OH, COOH o NH₂. Los grupos aldehído se pueden generar después de diferentes tratamientos conocidos en la técnica tales como: periodato, hidrólisis ácida, peróxido de hidrógeno, etc.

Enfoques para acoplamiento directo:

Sacárido-OH + CNBr o CDAP ----> éster cianato + NH₂-Prot --> conjugado

Sacárido-aldehído + NH₂-Prot ----> base Schiff + NaCNBH₃----> conjugado

Sacárido-COOH + NH₂-Prot + EDAC ----> conjugado

Sacárido-NH₂ + COOH-Prot + EDAC ----> conjugado

Enfoques para acoplamiento indirecto por medio de separador (enlazante):

Sacárido-OH + CNBr o CDAP ----> éster cianato + NH₂ ---- NH₂ ----> sacárido ---- NH₂ + COOH-Prot + EDAC ----> conjugado

Sacárido-OH + CNBr o CDAP ----> éster cianato + NH₂ ---- SH ----> sacárido ---- SH + SH-Prot (proteína natural con una cisteína expuesta u obtenida después de modificación de grupos amino de la proteína mediante SPDP por ejemplo) ----> sacárido-S-S-Prot

Sacárido-OH + CNBr o CDAP ----> éster cianato + NH₂ ---- SH ----> sacárido ---- SH + maleimida-Prot (modificación de grupos amino) ----> conjugado

Sacárido-COOH + EDAC + NH₂ ---- NH₂ ----> sacárido NH₂ + EDAC + COOH- Prot ----> conjugado

Sacárido-COOH + EDAC+ NH₂ ---- SH ----> sacárido ---- SH +
 SH-Prot (proteína natural con una cisteína expuesta u obtenida
 después de modificación de grupos amino de la proteína mediante
 SPDP por ejemplo) > sacárido-S-S-Prot

5 Sacárido-COOH + EDAC+ NH₂ ---- SH ----> sacárido ---- SH +
 maleimida-Prot (modificación de grupos amino) ----> conjugado

Sacárido-Aldehído + NH₂ ---- NH₂ ----> sacárido— NH₂ +
 EDAC + COOH-Prot ----> conjugado

Como se puede observar la química con carbodiimida (por
 10 ejemplo usando EDAC) es muy conveniente para reacciones de
 conjugación dado que hace uso de grupos en el sacárido y/o proteína
 que pueden estar presentes de manera natural o pueden ser
 insertados fácilmente por derivación. También enlaza
 convenientemente las fracciones mediante un enlace péptido.

15 Las carbodiimidas (RN=C=NR') son compuestos insaturados
 con una estructura aleno (Nakajima y Ikada 1995 Bioconjugate Chem.
 6:123-130; Hoare y Koshland 1967 JBC 242:2447-2453). La química
 es relativamente inestable en su pH (4.5-6.5) de reacción, y en
 consecuencia en la técnica se tiende a añadir juntos todos los
 20 componentes de la reacción de conjugación
 sacárido/proteína/carbodiimida.

Los inventores de la presente han encontrado que dependiendo
 de la naturaleza del sacárido y proteína que van a ser conjugados,
 se puede lograr mejores características del conjugado final para uso
 25 en la vacuna añadiendo cierto componente de la reacción lentamente

a la mezcla. Haciéndolo de esta forma se puede obtener uno o más beneficios o mejoras, tales como: rendimiento de sacárido en el conjugado, capacidad del conjugado de ser filtrado de manera estéril, mejor control de la conjugación, reproducibilidad más fácil, y/o prevención de enlaces cruzados entre porciones.

De acuerdo con esto, en una modalidad se proporciona un método para conjugar un sacárido con un portador proteína usando química de condensación por carbodiimida, en donde el sacárido contiene (por ejemplo como parte de su unidad de repetición), o ha sido derivado para que contenga, grupos grupos amino y/o grupos carboxilo, y en donde el portador proteína contiene, o ha sido derivado para que contenga, grupos grupos amino y/o grupos carboxilo, el método comprende los pasos de:

I) - si el portador proteína contiene tanto grupos amino como grupos carboxilo y el sacárido contiene ya sea grupos amino o grupos carboxilo:

a) mezclar el sacárido y la alícuota de carbodiimida requerida para realizar la conjugación, y

b) añadir la alícuota de portador proteína requerida durante un periodo de 35 segundos hasta 6 horas;

II) - si el sacárido contiene tanto grupos amino como grupos carboxilo y el portador proteína contiene ya sea grupos amino o grupos carboxilo:

a) mezclar el portador proteína y la alícuota de carbodiimida requerida para realizar la conjugación, y

b) añadir la alícuota de sacárido requerida durante un periodo de 35 segundos hasta 6 horas;

III) - si el sacárido contiene tanto grupos amino como grupos carboxilo y el portador proteína contiene tanto grupos amino como
5 grupos carboxilo:

a) mezclar el portador proteína y sacárido, y

b) añadir la alícuota de carbodiimida requerida para realizar la conjugación durante un periodo de 35 segundos hasta 6 horas.

Descripción detallada de la invención

10 Se puede usar cualquier carbodiimida apropiada siempre que sea capaz de conjugar sacáridos y proteínas en un medio acuoso. En una modalidad la carbodiimida puede ser EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) [también conocida como EDC] o puede ser una carbodiimida distinta de EDAC.

15 El término "sacárido" en esta especificación puede indicar polisacárido o oligosacárido e incluye a ambos. Puede indicar lipopolisacárido (LPS) o lipooligosacárido (LOS). Antes de su uso, los polisacáridos (tales como polisacáridos bacterianos) pueden ser aislados de una cepa fuente (por ejemplo de bacterias) o aislados de
20 la cepa fuente y ajustados en tamaño en algún grado mediante métodos conocidos (véase por ejemplo EP497524 y EP497525; Shousun Chen Szu et al. - Carbohydrate Research Vol 152 p7-20 (1986)) por ejemplo por microfluidización. Los polisacáridos se pueden ajustar en tamaño con el fin de reducir la viscosidad en
25 muestras de polisacárido y/o mejorar la capacidad de ser filtrados de

los productos conjugados. Los oligosacáridos tienen una baja cantidad de unidades de repetición (comúnmente 5-30 unidades de repetición) y comúnmente son polisacáridos hidrolizados.

El término "portador proteína" pretende cubrir tanto péptidos
5 pequeños como polipéptidos grandes (>10 kDa). Claramente es más probable que los polipéptidos grandes contengan tanto grupos amino como grupos carboxilo reactivos sin ninguna modificación.

Para los propósitos de la invención, "polisacárido natural" se refiere a un sacárido que no ha sido sometido a un proceso, cuyo
10 propósito es reducir el tamaño del sacárido. Un polisacárido puede reducirse de tamaño ligeramente durante procedimientos normales de purificación. Este tipo de sacárido es natural todavía. Solamente si el polisacárido ha sido sometido a técnicas de ajuste de tamaño el polisacárido podría no ser considerado natural.

15 Para los propósitos de la invención, "ajustado en tamaño en un factor de hasta x2" significa que el sacárido está sometido a un proceso para reducir el tamaño del sacárido pero que conserva un tamaño de más de la mitad del tamaño del polisacárido natural. X3, x4 etc. se deben interpretar de la misma forma, es decir, el sacárido
20 está sometido a un proceso para reducir el tamaño del polisacárido pero conserva un tamaño de más de la mitad del tamaño del polisacárido natural.

El periodo de tiempo de 35 segundos a 6 horas en el paso b) del método para la adición de la alícuota completa del componente
25 final puede ser 50 segundos hasta 5 horas, 1 minuto hasta 4 horas, 2

minutos hasta 3 horas, 3 minutos hasta 2 horas, 4 hasta 60 minutos, 5 hasta 50 minutos, 6 hasta 40 minutos, 7 hasta 30 minutos o 8 hasta 20 minutos. Puede ser 1 minuto hasta 5 horas, 10 minutos hasta 4 horas, 20 minutos hasta 3 horas, 30 minutos hasta 2 horas, 40 hasta 5 90 minutos, o 50 hasta 70 minutos. Este tiempo se puede ajustar de acuerdo con el sacárido y la proteína precisos que van a ser conjugados.

En una modalidad, la alícuota del componente final (por ejemplo of carbodiimida, sacárido o proteína) se le añade a la 10 mezcla de la reacción a una velocidad constante durante el periodo de tiempo (esto se logra convenientemente usando una bomba que funciona a una velocidad constante). Alternativamente se puede añadir en etapas durante el periodo de tiempo. Si bien esto se puede hacer en muchas formas, en general se debe añadir partes de la 15 alícuota durante el periodo. Por ejemplo al menos un cuarto de la alícuota se puede añadir durante la primera mitad del periodo, al menos un cuarto de la alícuota durante la segunda mitad del periodo. La cantidad total de la alícuota 'a' medida, por ejemplo, en mL o mg se puede añadir en 4-100 etapas ('s') durante el periodo. En una 20 modalidad las etapas se programan de tal forma que se introduzca una cantidad igual (a/s) en todas las etapas. En una modalidad, las etapas están separadas uniformemente durante el periodo 'p' (en segundos). De esta forma, si una etapa tiene lugar en el momento cero del periodo 'p¹', entonces cada etapa subsiguiente podría tener 25 lugar en un momento que es $p/(s-1)$. El volumen de la alícuota del

componente final añadido en el paso b) puede ser ajustado en términos de facilidad de adición de la alícuota a la reacción dentro del periodo de tiempo deseado. La carbodiimida puede ser añadida como una solución acuosa (comúnmente comúnmente amortiguada a un pH de 7.5 antes de ser añadida a la reacción) o como polvo sólido (EDAC por ejemplo es altamente soluble en medios acuosos). Por supuesto, si la carbodiimida es el último componente añadido a la reacción (situación III paso b)), se puede usar una carbodiimida de disolución lenta de tal forma que la alícuota completa de polvo sea añadida a la reacción de una sola vez, pero que se disuelva a una velocidad consistente con el periodo deseado durante el cual se va a hacer disponible la alícuota para la reacción.

Si la proteína y/o sacárido no tiene grupos amino o carboxilo (o solamente tiene uno de ellos), puede ser derivado(a) para proporcionarles uno (o para proporcionarles el otro que aún no tiene). Por ejemplo para un sacárido que solamente contiene grupos hidroxilo reactivos (por ejemplo sacárido capsular meningocócico del serogrupo A), este grupo se debe utilizar para la derivación de grupos amino o carboxilo de tal forma que se pueda llevar a cabo la condensación de EDAC.

Esta puede tener lugar dentro de una sub unidad de repetición, o puede ser un grupo que solamente está presente al final de la molécula de sacárido.

Se debe tener en cuenta que cuando tiene lugar la derivación, esto puede ser beneficioso para derivar la fracción sólo

parcialmente. Para los sacáridos con subunidades de repetición, el epítipo objetivo puede estar presente en cada repetición. En consecuencia si tiene lugar la derivación parcial (por esto se quiere decir que 0.5-20, 1-15, 3-12, o 5-10% del grupo reactivo deseado es derivado realmente) esto puede tener el beneficio de conservar la mayoría de los epítipos, y de evitar que haya demasiado entrecruzamiento.

Si un sacárido o proteína ya tiene grupos amino o carboxilo solamente (por ejemplo sacárido Vi de *Salmonella typhi* el cual de manera natural tiene grupos carboxilo pero no grupos amino), la derivación puede tener lugar para proporcionarle el otro tipo de grupo (es decir grupos amino para Vi). Se debe tener en cuenta, sin embargo, que como la derivación puede ser parcial, esta acción puede cambiar la reacción preferida de la invención de tipo I a tipo III. Por ejemplo si sacárido Vi se conjuga con un portador proteína tanto grupos amino como grupos carboxilo, la situación I añade la alícuota de proteína lentamente en el paso b). Si el grupo carboxilo sacárido Vi es derivado parcialmente con grupos amino éste tendrá tanto grupos carboxilo como grupos amino, por ello, en la situación III añadir la alícuota de carbodiimida lentamente en el paso b) se hace más relevante.

La derivación puede ocurrir mediante la adición de un enlazante hetero- u homo-bifuncional. Ésta puede tener lugar con química similar a la descrita arriba para el paso de conjugación de sacárido-proteína (por ejemplo CDAP o química con carbodiimida). El

enlazante puede tener entre 4 y 20, 4 y 12, o 5 y 10 átomos de carbono. Puede tener dos grupos amino reactivos, dos grupos carboxilo reactivos, o uno de cada uno (por ejemplo hexano diamina, ácido 6-aminocaproico, o dihidrazida de ácido adípico). Comúnmente
5 la derivación tiene lugar haciendo reaccionar un gran exceso del enlazante con el sacárido y/o portador proteína que va a ser derivado. Esto permite que la derivación tenga lugar con mínimo grado de entrecruzamiento entre fracciones (lo que si no, sería posible si por ejemplo a carboxilo grupo en un sacárido estuviera
10 siendo derivado con grupos amino usando condensación por carbodiimida). El enlazante en exceso se puede eliminar fácilmente usando técnicas tales como diafiltración.

En una modalidad, el sacárido comprende un grupo hidroxilo reactivo como parte de su unidad de repetición la cual es derivada
15 parcialmente por medio de un grupo amino en el enlazante (por ejemplo con química CDAP). En otra modalidad el sacárido incluye un grupo amino reactivo como parte de su unidad de repetición, la cual es derivada parcialmente por medio de un grupo carboxilo en el enlazante (por ejemplo con química con carbodiimida). En una
20 modalidad adicional el sacárido incluye un grupo carboxilo reactivo como parte de su unidad de repetición, el cual es derivado parcialmente por medio de un grupo amino en el enlazante (por ejemplo con química con carbodiimida).

La alícuota de carbodiimida requerida para realizar la
25 conjugación (si está presente en el paso a) o b) de la reacción de la

invención) es desde 0.01 hasta 3, desde 0.05 hasta 2, o desde 0.09 hasta 1 mg de carbodiimida/mg de sacárido. Si bien estos números se calculan con respecto a la EDAC que es la carbodiimida, estas cifras pueden ser ajustadas si se usa cualquier otra carbodiimida, multiplicando las cantidades en el rango por: (peso molecular de la
5 otra carbodiimida)/(peso molecular de EDAC).

En general, el sacárido puede estar presente en los métodos de la invención en una concentración final de 0.5-50 mg/ml en el paso b). Esto dependerá del tamaño y naturaleza del sacárido, y de la extensión de cualquier derivación. Por ejemplo, para los
10 oligosacáridos se requerirá una concentración mayor, pero para polisacáridos grandes será mucho más apropiada una concentración menor. Si está hacia el extremo alto de derivados parcialmente con grupos amino o carboxilo, puede ser apropiada una concentración menor para reducir la posibilidad de cualquier entrecruzamiento. El
15 portador proteína puede estar presente en una concentración final de 1-50 mg/ml en el paso b).

La proporción inicial de portador proteína con respecto a sacárido en los métodos de la invención puede ser desde 5:1 hasta 1:5, 4:1 hasta 1:1, o 3:1 hasta 2:1 (p/p). De nuevo, esto dependerá
20 del tamaño y naturaleza del sacárido, y de la extensión de cualquier derivación.

Las condiciones de sal (por ejemplo NaCl) también pueden variarse de acuerdo con la naturaleza del sacárido/proteína. Usualmente alrededor de NaCl 0.2 M puede estar presente en el
25

paso b) de los métodos de la invención, pero puede ser 0-2, 0.1-1 o 0.2-0.5 M.

En términos de pH en el paso b) de los métodos de la invención, el pH de la reacción puede ser cualquier pH en el cual la carbodiimida se active - por ejemplo pH 4.5-6.5, 4.7-6.0, o 5-5.5. Este pH comúnmente se mantiene en toda la reacción mediante la adición de ácido/base según se requiera. La EDAC usualmente es estable con un pH de 7.5, pese a que si se requiere hacer la conjugación también pueden estar presentes compuestos que se sabe que mantienen la reacción intermedia estable (tales como N-hidroxisuccinimida) en la reacción, en el paso b), en cuyo caso el pH de la reacción en el paso b) puede ser mantenido en un pH de 4.5-7.5.

La temperatura de la reacción durante paso b) de los métodos de la invención puede ser 4-37, 10- 32, 17-30, o 22-27 °C, y comúnmente se mantiene en el transcurso de la reacción.

En los métodos de la invención, una vez que la alícuota completa ha sido añadida en el paso b) la reacción comúnmente se mantiene durante 10 minutos adicionales hasta 72 horas, 20 minutos hasta 48 horas, 30 minutos hasta 24 horas, 40 minutos hasta 12 horas, 50 minutos hasta 6 horas, o 1-3 horas. Una vez que está terminada la reacción, el pH es ajustado a 7.5-9 (hacia el extremo más alto de éste si está presente N-hidroxisuccinimida) para regresar hacia el rango de pH estable de la carbodiimida.

Una vez conjugado, el conjugado sacárido-proteína puede ser

purificado a partir de: componentes que no reaccionaron, sacárido libre, etc. inyectándolo en una columna para cromatografía para exclusión por tamaño (por ejemplo Sephacryl S400HR, Pharmacia). Comúnmente, esto se lleva a cabo a 2-8 °C. El conjugado puede ser
 5 esterilizado por filtración y luego almacenado. Finalmente, se puede formular una dosis efectiva (por ejemplo 1-20, 2-15, o 3-10 µg sacárido /dosis) del conjugado sacárido-proteína con un excipiente aceptable farmacéuticamente (por ejemplo una sal o adyuvante) para fabricar una composición inmunogénica o vacuna.

10 En términos de los sacáridos de la invención, cualquier sacárido de fuente viral, fúngica, bacteriana o eucariótica puede ser conjugado usando los métodos de la invención. Éste puede ser el sacárido Vi de *Salmonella typhi*, o un sacárido distinto de Vi. Puede ser el sacárido capsular Hib de *H. influenzae* tipo b, o puede ser un
 15 sacárido distinto de Hib. En una modalidad el sacárido es un sacárido capsular bacteriano, por ejemplo derivado de una bacteria seleccionada de una lista que consiste en: *N. meningitidis* serogrupo A (MenA), B (MenB), C (MenC), W135 (MenW) o Y (MenY), *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N,
 20 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F o 33F, *Streptococcus* Grupo B grupo Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, o VII, *Staphylococcus aureus* tipo 5, *Staphylococcus aureus* tipo 8, *Salmonella typhi* (sacárido Vi), *Vibrio cholerae*, o *H. influenzae* tipo b.

25 El peso molecular promedio en peso del sacárido puede ser

1000-2000000, 5000-1000000, 10000-500000, 50000-400000, 75000-300000, o 100000-200000. El peso molecular o peso molecular promedio de un sacárido aquí se refiere peso molecular promedio en peso (PM) del sacárido medido antes de la conjugación y medido por

5 MALLS. La técnica MALLS es bien conocida en la materia, y comúnmente se lleva a cabo según se describe en ejemplo 2. Para el análisis MALLS de sacáridos, se puede usar dos columnas (TSKG6000 y 5000PWxl) en combinación, y los sacáridos se eluyen en agua. Los sacáridos se detectan usando un detector de dispersión

10 de luz (por ejemplo Wyatt Dawn DSP equipado con un láser de argón de 10 PM a 488nm) y un refractómetro interferométrico (por ejemplo Wyatt Otilab DSP equipado con una celda P100 y un filtro rojo a 498nm). En una modalidad, la polidispersidad del sacárido es de 1-1.5, 1-1.3, 1-1.2, 1- 1.1 o 1-1.05 y después de conjugación con una

15 proteína portadora, la polidispersidad del conjugado es de 1.0-2.5, 1.0-2.0. 1.0-1.5, 1.0-1.2, 1.5-2.5, 1.7-2.2 o 1.5-2.0. Todas las mediciones de polidispersidad son por MALLS.

El sacárido puede un polisacárido natural o puede haber sido ajustado en tamaño mediante un factor de no más de 2, 4, 6, 8, 10 o

20 20 veces (por ejemplo mediante microfluidización [por ejemplo mediante un aparato Emulsiflex C-50] u otra técnica conocida [por ejemplo métodos con calor, químicos, por oxidación, o por sonicación]). Los oligosacáridos pueden haber sido ajustado en tamaño de manera sustancialmente adicional [por ejemplo mediante

25 métodos conocidos con calor, químicos o por oxidación].

Las estructuras de la mayoría de estos sacáridos son conocidas (y en consecuencia si de manera natural tienen grupos amino o carboxilo para química con carbodiimida, o cualquier otro grupo reactivo que puede ser derivado con grupos amino o carboxilo

5 (véase la tabla siguiente).

		Grupo NH2 natural	Grupo COOH natural	Otro grupo reactivo
	<i>S. aureus</i>			
	PS5	No	Si	OH
10	PS8	No	Si	OH
	<i>N. meningitidis</i>			
	MenA	No	No	OH
	MenC	No	Si	OH
15	MenW135	No	Si	OH
	MenY	No	Si	OH
	MenB	No (puede ser generado si se des-N-acetila)	Si	OH / N-propilo
20				
	<i>Streptococcus</i> Gp. B			
	Ia, Ib	No	Si	OH
	II	No	Si	OH
25				

5	III	No	Sí	OH
	IV	No	Sí	OH
	V	No	Sí	OH
	VI	No	Sí	OH
	VII	No	Sí	OH
10				
	<i>S. typhi</i>			
	Vi	No	Sí	No
	<i>S. pneumoniae</i>			
15	PS1	Sí	Sí	OH
	PS3, 4, 5, 8, 9, 12F	No	Sí	OH
	<i>Vibrio cholerae</i>			
	Sacárido capsular	Sí	No	OH
20				
	<i>H. influenzae</i> B Hib	No	No	OH
	LOS			
	Nmen/Mcat/Hi	Sí en PEA	Sí en KDO	OH

El sacárido puede ser un lipooligosacárido o lipopolisacárido bacteriano (véase la tabla anterior), por ejemplo derivado de una bacteria seleccionada de una lista que consiste en: *N. meningitidis*,

H. influenzae, *E. coli*, *Salmonella* o *M. catarrhalis*. El LOS puede ser meningocócico del inmunotipo L2, L3 o L10. Puede estar destoxificado mediante tratamiento alcalino de su fracción lípida A.

En una modalidad, el sacárido capsular MenA, está al menos
5 parcialmente O-acetilado de tal forma que al menos 50%, 60%, 70%,
80%, 90%, 95% o 98% de las unidades de repetición estén O-
acetiladas en al menos una posición. O-acetilación por ejemplo está
presente en al menos la posición O-3 de al menos 50%, 60%, 70%,
80%, 90%, 95% o 98% de las unidades de repetición. En una
10 modalidad, el sacárido capsular MenC, está al menos parcialmente
O-acetilado de tal forma que al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,
80%, 90%, 95% o 98% de las unidades de repetición NeuNAc ($\alpha 2$
 $\rightarrow 9$)-ligadas, están O-acetiladas en al menos una o dos posiciones.
La O-acetilación por ejemplo está presente en la posición O-7 y/u O-
15 8 de al menos 30%. 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de
las unidades de repetición. En una modalidad, el sacárido capsular
MenW, está al menos parcialmente O-acetilado de tal forma que al
menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las
unidades de repetición están O-acetiladas en al menos una o dos
20 posiciones. La O-acetilación por ejemplo está presente en la posición
O-7 y/u O-9 de al menos 30%. 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%
o 98% de las unidades de repetición. En una modalidad, el sacárido
capsular MenY, está al menos parcialmente O-acetilado de tal forma
que al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o
25 98% de las unidades de repetición están O-acetiladas en al menos

61

una o dos posiciones. La O-acetilación está presente en la posición 7 y/o 9 de al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de las unidades de repetición. El porcentaje de O-acetilación se refiere al porcentaje de las unidades de repetición que contienen O-acetilación. Éste puede ser medido en el sacárido antes de ser conjugado y/o después de la conjugación.

El portador proteína puede ser cualquier péptido o proteína. Éste puede contener uno o más epítopos T auxiliares. En una modalidad de la invención, el portador proteína se selecciona del grupo que consiste en: TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, proteína D de *H. influenzae*, PhtD neumocócica, y neumolisina neumocócica. La proteína portadora puede ser toxoide tetánico (TT), toxoide tetánico fragmento C, mutantes no tóxicos de toxina tetánica [nótese que todas estas variantes de TT se consideran del mismo tipo de proteína portadora para los propósitos de esta invención], toxoide diftérico (DT), CRM197, otros mutantes no tóxicos de toxina diftérica [tales como CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida et al. J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; delección o mutación de Glu-148 en Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 en Gly y otras mutaciones que se describen en US 4709017 o US 4950740; mutación de al menos uno o más residuos de Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones que se describen en US 5917017 o US 6455673; o

fragmento que se describen en US 584371 1] (nótese que todas estas variantes de DT se considera que son del mismo tipo de proteína portadora para los propósitos de esta invención), neumolisina neumocócica (Kuo et al (1995) Infect Immun 63; 2706-
5 13), OMPC (proteína meningocócica de membrana exterior - usualmente extraída de *N. meningitidis* serogrupo B - EP0372501), péptidos sintéticos (EP0378881, EP0427347), proteínas de choque por calor (WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas de tosferina (WO 98/58668, EP0471177), citocinas, linfocinas, factores de crecimiento
10 u hormonas (WO 91/01146), proteínas artificiales que contienen múltiples epítomos de células T CD4+ humanas de diversos antígenos derivados de patógenos (Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31 ; 3816-3824) tales como proteína N19 (Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72; 4884-7) proteína superficial neumocócica
15 PspA (WO 02/091998), proteínas de absorción de hierro (WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (WO 00/61761), Proteína D de *H. influenzae* (EP594610 y WO 00/56360), PhtA neumocócica (WO 98/18930, también denominada Sp36), PhtD neumocócica (que se describe en WO 00/37105, y también se denomina SpO36D), PhtB
20 neumocócica (que se describe en WO 00/37105, y también se denomina SpO36B), o PhtE (que se describe en WO00/30299 y se denomina BVH-3).

En un aspecto adicional de la invención se proporciona conjugado de sacárido-portador proteína (o una composición
25 inmunogénica o vacuna) obtenible u obtenida mediante el método de

la invención.

Un uso de la composición inmunogénica o vacuna de la invención en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de una enfermedad, y también se proporciona un método
5 para prevenir o tratar una enfermedad que comprende el paso de administrar una dosis efectiva de la composición inmunogénica o vacuna de la invención a un paciente que necesita de ello. El uso o método puede ser tal que la enfermedad es causada por una bacteria seleccionada de una lista que consiste en: *N. meningitidis*,
10 *Streptococcus pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *Streptococcus* Grupo B, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, y *H. influenzae*.

Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden incluir una vacuna DTPa o DTPw (por ejemplo una que
15 contiene DT, TT, y ya sea una vacuna de célula entera de tosferina (Pw) o una vacuna acelular de tosferina (Pa) (que contiene por ejemplo toxoide de tosferina, FHA, pertactina, y, opcionalmente aglutinógenos 2 y 3). Estas combinaciones también pueden incluir una vacuna contra hepatitis B (por ejemplo puede contener antígeno
20 superficial de hepatitis B [HepB], opcionalmente adsorbido en fosfato de aluminio). En una modalidad la composición inmunogénica de la invención contiene Hib, conjugados de sacárido MenA y MenC, o conjugados de sacárido Hib y MenC, o conjugados de sacárido Hib, MenC y MenY, o conjugados de sacárido MenA, MenC, MenW y
25 MenY, en donde al menos uno, dos, o todos los conjugados de

64

sacárido se elaboran de acuerdo con el método de la invención.

Las composiciones inmunogénicas de la invención opcionalmente contienen antígenos virales adicionales confiriendo protección contra la enfermedad producida por sarampión y/o 5 paperas y/o rubeola y/o varicela. Por ejemplo, la composición inmunogénica de la invención contiene antígenos de sarampión, paperas y rubeola (MMR) o sarampión, paperas, rubeola y varicela (MMRV). En una modalidad, estos antígenos virales están presentes opcionalmente en el mismo envase que el conjugado o conjugados 10 meningocócicos y/o de sacárido Hib presentes en la composición. En una modalidad, estos antígenos virales están liofilizados.

En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención contiene además un antígeno de *N. meningitidis* serogrupo B. El antígeno es opcionalmente una preparación de vesícula de 15 membrana exterior de *N. meningitidis* serogrupo B según se describe en EP301992, WO 01/09350, WO 04/14417, WO 04/14418 y WO 04/14419.

En general, la composición inmunogénica de la invención puede contener una dosis de cada conjugado sacárido de entre 0.1 y 20 20 μg , 2 y 10 μg , 2 y 6 μg o 4 y 7 μg de sacárido.

"Alrededor de" o "aproximadamente" se definen como valores dentro de 10% más o menos de la cifra proporcionada para los propósitos de la invención.

En una modalidad, la composición inmunogénica de la 25 invención está ajustada o amortiguada hasta, o ajustada a un pH de

entre 7.0 y 8.0, pH 7.2 y 7.6 o a un pH de alrededor o exactamente de 7.4.

La composición inmunogénica o vacunas de la invención opcionalmente están liofilizadas en la presencia de un agente estabilizante, por ejemplo un poliol tal como sacarosa o trehalosa.

Opcionalmente, la composición inmunogénica o vacuna de la invención contiene una cantidad de un adyuvante suficiente para mejorar la respuesta inmunitaria al inmunógeno. Los adyuvantes apropiados incluyen, sin limitarse a ellos, sales de aluminio (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), mezclas de escualeno (SAF-1), péptido muramilo, derivados de saponina, preparaciones de pared celular de micobacteria, lípido A monofosforilo, derivados de ácido micótico, agentes tensoactivos de copolímeros en bloque no iónicos, Quil A, sub unidad B de la toxina del cólera, polifosfaceno y derivados, y complejos inmunoestimulantes (ISCOM) tales como los descritos por Takahashi et al. (1990) Nature 344:873-875.

Para las combinaciones de *N. meningitidis* o HibMen, puede ser ventajoso no utilizar ningún adyuvante de sal de aluminio o cualquier adyuvante.

Tal como con todas las composiciones inmunogénicas o vacunas, las cantidades efectivas inmunológicamente de los inmunógenos tienen que ser determinadas empíricamente. Los factores que debe considerarse incluyen la inmunogenicidad, ya sea que el inmunógeno esté formando complejos o unido covalentemente a un adyuvante o proteína portadora u otro

portador, vías de administración y la cantidad de dosis de inmunización que se van a administrar.

El agente activo puede estar presente en concentraciones variables en la composición farmacéutica o vacuna de la invención.

5 Comúnmente, la concentración mínima de la sustancia es una cantidad necesaria para obtener su uso pretendido, mientras que la concentración máxima es la cantidad máxima que permanecerá en solución o suspendida homogéneamente dentro de la mezcla inicial. Por ejemplo, la cantidad mínima de un agente terapéutico
10 opcionalmente es una que proporcionará una sola dosis efectiva terapéuticamente. Para las sustancias bioactivas, la concentración mínima es una cantidad necesaria para bioactividad con la reconstitución y la concentración máxima está en el punto en el cual no se puede mantener una suspensión homogénea. En el caso de
15 unidades de una sola dosis, la cantidad es la de una sola aplicación terapéutica. Generalmente, se espera que cada dosis contenga 1-100 μg de antígeno de proteína, opcionalmente 5-50 μg o 5-25 μg . Por ejemplo, las dosis de sacáridos bacterianos son de 10-20 μg , 5-10 μg , 2.5-5 μg o 1-2.5 μg de sacárido en el conjugado.

20 Las preparaciones para vacuna de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar a un mamífero (por ejemplo un paciente humano) susceptible a infección, por medio de administrar dicha vacuna por vía sistémica o por vía mucosa. Un paciente humano opcionalmente es un infante (de menos de 12 meses), un
25 niño pequeño (12-24, 12-16 o 12-14 meses), un niño (2-10, 3-8 o 3-5

años) un adolescente (12-21, 14-20 o 15-19 años) o un adulto. Estas administraciones pueden incluir inyección por medio de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o por medio de administración en las mucosas para los ractos

5 oral/alimenticio, respiratorio, genitourinario. La administración intranasal administration de vacunas para el tratamiento de pneumonia o de otitis media se prefiere (dado que el transporte nasofaríngeo de los neumococos puede evitarse de manera más efectiva, atenuando así la infección en su etapa más temprana). Si

10 bien la vacuna de la invención puede ser administrada como una sola dosis, sus componentes también pueden ser coadministrados juntos al mismo tiempo o en diferentes momentos (por ejemplo si en una vacuna están presentes sacáridos, estos podrían ser administrados por separado, al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la

15 administración de una vacuna de proteína bacteriana para la coordinación óptima de las respuestas inmunitarias con respecto a cada uno de los otros). Además de una sola vía de administración, se puede usar 2 vías de administración diferentes. Por ejemplo, se puede adminsitrar antígenos virales ID (intradérmico), mientras que

20 las proteínas bacterianas se pueden administrar IM (intramuscular) o EN (intranasal). Si están presente sacáridos, se pueden administrar IM (o ID) y las proteínas bacterianas se pueden administrar EN (o ID). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar IM para dosis de sensibilización y EN para dosis de refuerzo.

25 La preparación de vacunas se describe en general en Vaccine

Design ("The subunit and adjuvant approach" (Ed. Powell M. F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). La encapsulación con liposomas es descrita por Fullerton, patente estadounidense 4,235,877.

5 Un aspecto adicional de la invención es un proceso para elaborar la composición inmunogénica o vacuna de la invención, que comprende el paso de mezclar los sacáridos MenA y MenC de la invención elaborados mediante el método de la invención, con MenW y MenY que no han sido elaborados de acuerdo con la invención, y
10 con un excipiente aceptable farmacéuticamente.

Los términos "que comprende", "incluye" y "contiene" como se usan aquí, tienen la intención por parte de los inventores, de ser sustituibles opcionalmente con los términos "consiste en" "está constituido por" y "que consiste en", respectivamente, en cada caso.

15 Todas las referencias o solicitudes de patente citadas dentro de esta especificación de patente están incorporadas aquí mediante referencia.

La invención se ilustra en los ejemplos siguientes. Los ejemplos que siguen se llevan a cabo usando técnicas estándar, las
20 cuales son bien conocidas, así como también la rutina para las personas hábiles en la técnica, excepto cuando se describe en detalle otra cosa. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

Ejemplos

25 **Ejemplo 1 - Preparación de conjugados de polisacárido**

Ejemplo 1a - Preparación de conjugado de polisacárido capsular meningoóccico MenA y MenC de acuerdo con la invención

Se produjeron conjugados MenC-TT se produjeron usando polisacáridos naturales (de más de 150 kDa medido mediante
5 MALLS) o se microfluidizaron ligeramente. Se produjeron conjugados MenA-TT usando polisacárido natural o polisacárido ligeramente microfluidizado de más de 60 kDa medido mediante el método MALLS para el ejemplo 2. El ajuste de tamaño fue por microfluidización usando un aparato homogenizador Emulsiflex C-50.
10 Los polisacáridos se filtraron entonces a través de un filtro de 0.2 μm .

Con el fin de conjugar polisacárido capsular MenA con toxoide tetánico por medio de un separador, se usó el método siguiente. El enlace covalente del polisacárido y el separador (ADH) se lleva a
15 cabo mediante una química de acoplamiento mediante la cual el polisacárido es activado bajo condiciones controladas por un agente cianilante, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP). El separador reacciona con el PS cianilado mediante sus grupos hidrazino, para formar un enlace isourea estable entre el
20 separador y el polisacárido.

Se trató 10mg/ml de una solución de MenA (pH 6.0) [3.5 g] con 100 mg/ml de una solución recién preparada de CDAP en acetonitrilo/agua (50/50 (v/v)) para obtener una proporción CDAP/MenA de 0.75 (p/p). Después de 1.5 minutos, se elevó el pH
25 hasta un pH de 10.0. Tres minutos después, se añadió ADH para

obtener una proporción de ADH/MenA de 8.9. Se disminuyó el pH de la reacción hasta 8.75 y la reacción prosiguió durante 2 horas manteniendo este pH (manteniendo la temperatura a 25 °C).

La solución de PSA_{AH} se concentró hasta un cuarto de su volumen inicial y luego se diafiltró con 30 volúmenes de NaCl 0.2 M usando una membrana Filtron Omega con un corte de 10 kDa, y se filtró el retenido.

Antes de la reacción de conjugación (condensación por carbodiimida), la solución TT purificada y la solución de PSA_{AH} se diluyeron hasta alcanzar una concentración de 10 mg/ml para PSA_{AH} y 10mg/ml para TT.

Se le añadió EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida) a la solución de PS_{AH} (2g de sacárido) con el fin de alcanzar una proporción final de 0.9 mg EDAC/mg PSA_{AH}. Se ajustó el pH hasta 5.0. Se le añadió toxoide tetánico purificado con una bomba peristáltica (en 60 minutos) hasta alcanzar 2 mg TT/mg PSA_{AH}. La solución resultante se dejó 60 min a +25°C bajo agitación para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 min. Se neutralizó la solución mediante la adición de Tris-HCl 1 M con pH de 7.5 (1/10 del volumen final) y se dejó 30 minutos a +25°C, luego durante la noche a +2°C hasta +8°C.

El conjugado se clarificó usando un filtro de 10 µm y se purificó usando una columna Sephacryl S400HR (Pharmacia, Suecia). Se equilibró la columna en 10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.075 M NaCl y el conjugado (aprox. 660 mL) se cargó en la columna (+2 °C hasta

+8°C). El grupo para elución se seleccionó como una función de densidad óptica a 280 nm. La recolección comenzó cuando la absorbancia aumentó a 0.05. La recolección continuó hasta que la Kd alcanzó 0.30. El conjugado se esterilizó por filtración a +20 °C, luego se almacenó a +2 °C hasta +8 °C. El conjugado resultante tuvo una proporción polisacárido:proteína de 1:2-1:4 (p/p).

Con el fin de conjugar el polisacárido capsular MenC con toxoide tetánico por medio de un separador, se usó el método siguiente. El enlace covalente del polisacárido y el separador (ADH) se lleva a cabo mediante una química de acoplamiento mediante la cual el polisacárido es activado bajo condiciones controladas por un agente cianilante, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP). El separador reacciona con el PS cianilado mediante sus grupos hidrazino, para formar un enlace isourea estable entre el separador y el polisacárido.

Se trató 20mg/ml de una solución de MenC (pH6.0) (3.5 g) con 100 mg/ml de una solución recién preparada de CDAP en acetonitrilo/agua (50/50 (v/v)) para obtener una proporción de CDAP/MenC de 1.5 (p/p). Después de 1.5 minutos, se elevó el pH hasta un pH de 10.0. En el pH de activación se le añadió NaCl 5 M hasta obtener una concentración final de NaCl 2 M. Tres minutos después, se le añadió ADH para obtener una proporción de ADH/MenC de 8.9. Se disminuyó el pH de la reacción hasta 8.75 y la reacción prosiguió durante 2 horas (mantenida a 25 °C).

La solución de PSC_{AH} se concentró hasta un mínimo de 150 mL

y luego se diafiltró con 30 volúmenes de NaCl 0.2 M usando una membrana Filtron Omega con un corte de 10 kDa, y se filtró el retenido.

Antes de la reacción de conjugación, la solución TT purificada
5 y la solución de PSC_{AH} (2g en báscula) se diluyeron en NaCl 0.2 M hasta alcanzar una concentración de 15 mg/ml para PSC_{AH} y 20mg/ml para TT.

Se le añadió el toxoide tetánico purificado a la solución de PSC_{AH} con el fin de alcanzar 2 mg de TT/mg PSC_{AH}. Se ajustó el pH
10 hasta 5.0. Se le añadió EDAC (16.7 mg/ml en Tris 0.1 M pH 7.5) con una bomba peristáltica (en 10 minutos) hasta alcanzar una proporción final de 0.5 mg EDAC/mg PSC_{AH}. La solución resultante se dejó 110 min a +25°C bajo agitación y regulación de pH para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 min. Luego se
15 neutralizó la solución mediante la adición de Tris-HCl 1 M con pH de 9.0 (1/10 del volumen final) y se dejó 30 minutos a +25°C, luego durante la noche a +2°C hasta +8°C. El conjugado se clarificó usando un filtro de 10 μ m y se purificó usando una columna Sephacryl S400HR (Pharmacia, Suecia). Se equilibró la columna en
20 10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.075 M NaCl y el conjugado (aprox. 460 mL) se cargó en la columna (+2 °C hasta +8°C). El grupo para elución se seleccionó como una función de densidad óptica a 280 nm. La recolección comenzó cuando la absorbancia aumentó a 0.05. La recolección continuó hasta que la Kd alcanzó 0.20. El conjugado
25 se esterilizó por filtración a +20°C, luego se almacenó a +2°C hasta

+8°C. El conjugado resultante tuvo una proporción polisacárido:proteína de 1 :2-1 :4 (p/p).

Se llevaron a cabo diversos experimentos para añadir EDAC durante 10-45 minutos - en cada caso el resultado fue Conjugados MenC de buena calidad. Si a pesar de que el portador TT se añadió de último lentamente a la mezcla de MenC-ADH + EDAC, esto condujo a un gel- un conjugado que no pudo ser purificado.

También se llevaron a cabo experimentos para añadir el EDAC de una sola vez a la reacción, pero la proporción final de TT/PS (2.771) (p/p) del conjugado fue más baja que la del conjugado obtenido por medio de la reacción en donde se añadió EDAC durante 10 minutos (3.3/1); adicionalmente, las antigenicidades de α TT y α PS fueron ambas menores que la medida con respecto al conjugado elaborado mediante la reacción en donde se añadió EDAC durante 10 minutos.

Nota sobre el % aproximado de derivación de los polisacáridos

MenCAH: después de tratamiento de CDAP con ADH aproximadamente 3.47% de los grupos hidroxilo fueron derivados con ADH (con una estimación de dos grupos hidroxilo disponibles por subunidad de repetición). Para MenA: aproximadamente 11.5% de grupos hidroxilo derivados con ADH (considerando que solamente hay un grupo hidroxilo por unidad de repetición).

Ejemplo 1 b - preparación de polisacárido conjugado capsular neumocócico PS 3

25 **1) Proceso PS03-TT_{AH}: PS03-TT_{AH}208**

Ajuste de tamaño con Emulsiflex

Se pesó el PS sobre la base de 10% de contenido teórico de humedad. El PS natural se disolvió durante la noche en NaCl 2 M a una concentración inicial de 3 mg/ml. Antes del ajuste de tamaño, la
5 solución de PS natural se clarificó en corte de filtro de 5 μm .

Se usó un aparato homogenizador Emulsiflex C-50 para reducir el peso molecular y la viscosidad del polisacárido antes del paso de activación. La eficiencia del ajuste de tamaño depende de la presión del circuito, la presión de alimentación del émbolo y del número total
10 de ciclos. Con el fin de mejorar la eficiencia del ajuste de tamaño (y en consecuencia reducir la cantidad total de ciclos), la celda de homogenización del Emulsiflex fue reemplazada con una celda con una geometría fija (Cámara de interacción Microfluidics F20Y-0.75 μm). El objetivo del ajuste de tamaño fue reducir el peso
15 molecular y la viscosidad del PS sin una disminución crítica de su antigenicidad.

La reducción de tamaño se realizó a 41.36 ± 3.4 MPa (6000 ± 500 psi) y se le hizo seguimiento en proceso mediante una medición de viscosidad. El ajuste de tamaño se detuvo cuando se alcanzó el
20 objetivo de 2.0 ± 0.2 cp.

Filtración de PS con tamaño ajustado en 0.22 μm

Se filtró PS con tamaño ajustado en una membrana Millipak 40 (corte 0.22 μm) a una velocidad de flujo de 10 ml/min.

Derivación de TT

25 El paso de derivación se realizó a 25°C bajo agitación continua

en un baño de agua con temperatura controlada. TT se diluyó en NaCl 0.2M para obtener una concentración final de TT de 25mg/ml. Se le añadió ADH en forma sólida a la solución de TT hasta alcanzar una concentración final de 0.2 M. Después de completar la disolución de ADH, se estableció la solución a un pH de 6.2+/- 0.1 con HCl. Luego se le añadió EDAC a la solución de TT/ADH hasta alcanzar una concentración final de 0.02 M. Se estableció el pH en 6.2+/-0.1 con HCl y se mantuvo bajo regulación de pH durante 1 hora. Después del paso de derivación, se elevó el pH hasta un pH de 9.5 con NaOH para detener la reacción. La solución se dejó durante 2 horas bajo regulación de pH antes del paso de diafiltración.

Diafiltración

Se diafiltró el derivado TT_{AH} con el fin de eliminar los subproductos de ADH y EDAC que no reaccionaron.

Se realizó la diafiltración en una membrana Centramate (0.09 m², corte 10 kDa). La solución fue dializada contra 20 volúmenes de NaCl 0.2 M.

El seguimiento del paso de diafiltración se realizó mediante una cuantificación de ADH (análisis TBNS) en el permeado después de 5, 10, 15 y 20 volúmenes de diafiltración.

Filtración en 0.22 μ m

TT_{AH} se filtró finalmente en una membrana con corte de 0.22 μ m (Millipack 40) a una velocidad de flujo de 10 ml/min. El TT_{AH} filtrado se almacenó entonces a -70 °C

Conjugado PS3-TT_{AH}

Las condiciones del proceso fueron las siguientes:

Una concentración inicial de PS3 de 2 mg/ml en NaCl 2 M, una proporción inicial de TT_{AH}/PS3 de 1.5/1 (p/p), una concentración de EDAC de 0.5 mg/mg PS, y una concentración de TT de 10 mg/ml en
5 NaCl 0.15 M.

Se diluyeron 50 mg de PS3 en NaCl 2 M para obtener una concentración final de PS de 2 mg/ml. La solución de TT_{AH} purificada se diluyó en NaCl 0.2 M hasta alcanzar una concentración de 10 mg/ml.

10 La solución de PS3 se ajustó hasta un pH de 5 con HCl.

Se añadió EDAC en forma sólida a la solución de PS3 con el fin de alcanzar una concentración final de 0.5 mg EDAC/ mg PS. Se ajustó el pH hasta 5.0 ± 0.05 con HCl y TT_{AH} se añadió manualmente en 11 minutos (alícuotas/min). Se incubó la solución resultante 109
15 min a + 25°C con agitación y regulación de pH para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 min. Luego se neutralizó la solución mediante la adición de Tris-HCl 1 M con pH de 7.5 y se dejó 30 min a +25°C.

Se clarificó el conjugado finalmente en una membrana de 5 μ m
20 y se inyectó en una Columna Sephacryl S400HR.

2) Proceso PS03-TT_{AH}: PS03_{AH}-TT215

Ajuste de tamaño por Emulsiflex

Como se indicó en lo anterior.

Filtración de PS ajustado en tamaño en 0.22 μ m

25 Como se indicó en lo anterior.

Derivación de PS3

El paso de derivación se realizó a 25°C bajo agitación continua en un baño de agua con temperatura controlada. Se diluyó PS3 en NaCl 2M para obtener una concentración final de PS de 3mg/ml. La solución de PS se fijó con un pH de 6.0 antes de la adición de CDAP (0.25mg/mg PS, disolución a 100mg/ml en una mezcla de acetonitrilo/ WFI). Se aumentó el pH hasta pH9.5 con NaOH antes de la adición de ADH (8.9mg ADH/mg PS, disolución en 100 mg/ml en NaCl 0.2 M). El pH se mantuvo en 9.5 y se reguló durante 60 minutos. El porcentaje de derivación correspondió a 2.4% (2.4 mg ADH/ 100 mg PS). Ésta puede ser medida con técnicas conocidas: TNBS para la estimación de ADH; y DMAB o resorcinol (Monsigny et al (1988) Anal. Biochem. 175, 525-530) para la cuantificación de PS. En este caso, la dosis de TNBS fue de 228 $\mu\text{g/ml}$ y la dosis de PS: 5250 $\mu\text{g/ml}$.

Dado que el PM de ADH es de 174.2, y el PM de la unidad de repetición de PS3 es de 338.27 (con 1 COOH y 4 grupos OH), hay 1.3 μmoles de ADH / 15.52 μmol de unidad de repetición, o 1.3 μmoles de ADH / 62.08 μmol de grupo hidroxilo reactivo. 2.09% de los grupos hidroxilo PS3 fueron grupos hidroxilo modificados con ADH.

Diafiltración

Se diafiltró el derivado PS3_{AH} con el fin de eliminar los subproductos ADH y CDAP que no reaccionaron. Se realizó la diafiltración en una membrana UFP-30-C-H24LA (42 cm², corte 30

kDa). La solución fue dializada contra 20 volúmenes de NaCl 0.2 M. El seguimiento del paso de diafiltración se realizó mediante una cuantificación de ADH (análisis TBNS) en el permeado después de 5, 10, 15 y 20 volúmenes de diafiltración.

5 **Filtración en 0.22 μ m**

Se filtró finalmente PS_{AH} en membrana con corte de 0.22 μ m (Millipack 40) a una velocidad de flujo de 10 ml/min. El PS_{3AH} filtrado se almacenó entonces a 4°C.

Conjugado PS_{3AH}-TT

10 Las condiciones del proceso fueron las siguientes:

Una concentración inicial de PS₃ de 2 mg/ml en NaCl 2 M, una proporción inicial de TT/PS_{3AH} de 1.5/1 (p/p), una concentración de EDAC de 0.5 mg/mg PS, y una concentración de TT de 10 mg/ml en 0.15M NaCl.

15 Se diluyó 50 mg de PS_{3AH} en NaCl 0.2 M para obtener una concentración final de PS de 2 mg/ml. La solución TT purificada se diluyó en NaCl 0.2 M hasta alcanzar una concentración de 10 mg/ml. La solución de PS_{3AH} se ajustó hasta un pH de 5 con HCl.

20 Se añadió EDAC en forma sólida a la solución de PS_{3AH} con el fin de alcanzar una concentración final de 0.5 mg EDAC/ mg PS. Se ajustó el pH hasta 5.0 ± 0.05 con HCl y se le añadió TT en 10 minutos usando una bomba peristáltica. Se incubó la solución resultante 110 min a + 25°C con agitación y regulación de pH para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 min. Luego se
25 neutralizó la solución mediante la adición de Tris-HCl 1 M con pH de

7.5 y se dejó 30 min a +25°C. Se clarificó el conjugado finalmente en una membrana de 5 μm y se inyectó en una Columna Sephacryl S400HR.

3) Proceso PS03AH-TT: PS3AH-TT217

5 Ajuste de tamaño por Emulsiflex

Como se indicó en lo anterior.

Filtración de PS ajustado en tamaño en 0.22 μm

Como se indicó en lo anterior.

Derivación de PS3

10 Igual que para el conjugado 215.

Diafiltración

Igual que para el conjugado 215.

Filtración en 0.22 μm

Igual que para el conjugado 215.

15 Conjugado PS3_{AH}-TT

Las condiciones del proceso fueron las siguientes:

Una concentración inicial de PS3 de 2 mg/ml en NaCl 2 M, una proporción inicial de TT/PS3_{AH} de 1.5/1 (p/p), una concentración de EDAC de 0.5 mg/mg PS, y una concentración de TT de 10 mg/ml en
20 0.15M NaCl.

Se diluyó 50 mg de PS3_{AH} en NaCl 0.2 M para obtener una concentración final de PS de 2 mg/ml. La solución TT purificada se diluyó en NaCl 0.2 M hasta alcanzar una concentración de 10 mg/ml.

Las soluciones de PS3_{AH} y TT se mezclaron y se ajustó el pH
25 hasta 5 con HCl.

Se disolvió EDAC en un amortiguador Tris 1M con pH de 7.5. Se añadió 40 μ l de EDAC cada minuto (10 minutos hasta alcanzar la proporción EDAC/PS (0.5 mg EDAC/ mg PS)). Se incubó la solución resultante 110 min a + 25 °C bajo agitación y regulación de pH para
 5 obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 min. Luego se neutralizó la solución mediante la adición de Tris-HCl 1 M con pH de 7.5 y se dejó 30 min a +25°C. Se clarificó el conjugado finalmente en una membrana de 5 μ m y se inyectó en una Columna Sephacryl S400HR.

10 **4) Proceso PS03AH-TT: PS3AH-TT218**

Ajuste de tamaño por Emulsiflex

Como se indicó en lo anterior.

Filtración de PS ajustado en tamaño en 0.22 μ m

Como se indicó en lo anterior.

15 **Derivación de PS3**

El paso de derivación se realizó a 25°C con agitación continua en un baño de agua con temperatura controlada. Se diluyó PS3 en NaCl 2M para obtener una concentración final de PS de 3mg/ml. Se añadió EDAC en forma sólida hasta alcanzar una proporción de
 20 EDAC/ PS de 0.1 mg/mg PS. Después de disolución completa, se estableció el pH de la solución en 5. Luego se le añadió ADH (8.9mg ADH/mg PS, disolución a 100 mg/ml en NaCl 0.2 M) usando una bomba peristáltica en 44 minutos (pese a que estuvo presente un exceso de ADH como tal, la adición directa también pudo haber sido
 25 apropiada). El pH se mantuvo en 5.0+/-0.1 y se reguló durante 120

minutos (44' + 76'). Se detuvo la reacción aumentando el pH hasta 7.5 usando hidróxido de sodio. El porcentaje de derivación correspondió a 3.7% (mg ADH/ mg PS). La dosis de TNBS fue de 220 $\mu\text{g/ml}$ y la dosis de PS fue de 5902 $\mu\text{g/ml}$, de esta manera hay 1.26 μmoles de ADH / 17.44 μmol de unidad de repetición ($=\mu\text{mol}$ de grupo COOH reactivo). Así, 7.22% de los grupos carboxilo PS3 fueron grupos COOH modificados con ADH.

Diafiltración

Se diafiltró derivado PS3_{AH} con el fin de eliminar los subproductos de ADH y EDAC que no reaccionaron. Se realizó la diafiltración en una membrana UFP-30-C-H24LA (42 cm², corte 30 kDa). La solución fue dializada contra 23 volúmenes de NaCl 0.2 M.

El seguimiento del paso de diafiltración se realizó mediante una cuantificación de ADH (análisis TBNS) en el permeado después de 5, 10, 15 y 20 volúmenes de diafiltración

Filtración en 0.22 μm

Se filtró PS_{AH} finalmente en membrana en corte de 0.22 μm (Millipack 40) a una velocidad de flujo de 10 ml/min. El PS3_{AH} filtrado se almacenó entonces a 4°C.

Conjugado PS3_{AH}-TT

Las condiciones del proceso fueron las siguientes:

Una concentración inicial de PS3_{AH} de 2 mg/ml en NaCl 2 M, una proporción inicial de TT/PS3_{AH} de 1.5/1 (p/p), una concentración de EDAC de 0.5 mg/mg PS, y una concentración de TT de 10 mg/ml en 0.15M NaCl.

Se diluyó 50 mg de PS_{3AH} en NaCl 0.2 M para obtener una concentración final de PS de 2 mg/ml.

La solución TT purificada se diluyó en NaCl 0.2 M hasta alcanzar una concentración de 10 mg/ml.

5 Las soluciones de PS_{3AH} y TT fueron mezcladas juntas. Se ajustó el pH hasta 5.0 ± 0.05 con HCl y EDAC se añadió manualmente en 10 minutos (alícuotas en partes iguales añadidas cada minuto). Se incubó la solución resultante 110 min a + 25°C con agitación y regulación de pH para obtener un tiempo de acoplamiento
10 final de 120 min.

Luego se neutralizó la solución mediante la adición de Tris-HCl 1 M con pH de 7.5 y se dejó 30 min a +25°C. Se clarificó el conjugado finalmente en una membrana de 5 μ m y se inyectó en una Columna Sephacryl S400HR.

15 **Conclusiones:**

Se elaboraron diferentes conjugados usando química con carbodiimida en el paso de conjugación. El último componente añadido en la solución de la reacción puede ser la proteína TT o el reactivo EDAC. El tiempo de adición puede tener un efecto sobre los
20 conjugados resultantes.

Conjugados PS_{3A}HTT215 y 217:

Se usaron los mismos componentes y condiciones para preparar ambos conjugados. La forma en la cual se añadió el último componente fue diferente. El conjugado PS_{3AH}TT217 condujo a un
25 producto que cumplió los criterios *in-vitro*. Éste se elaboró añadiendo



EDAC en 10 minutos.

El conjugado PS3_{AH}TT215, sin embargo, no se pudo filtrar en membrana estéril. Para este, el último componente añadido en el medio de la reacción fue el TT (en 10 minutos). Las proporciones
5 finales de TT/PS fueron grandemente diferentes para ambos conjugados (0.98/1 contra 0.50/1). Si el EDAC es añadido primero al PS_{AH} (que tiene tanto grupos amino como grupos carboxilo reactivos) esto puede conducir a entrecruzamiento entre hidrazina y grupos ácido carboxílico presentes en el polisacárido, y por ello podría
10 conducir a un conjugado más entrecruzado con una proporción final más débil después de la adición de TT en 10 minutos.

Este efecto no se observa para el conjugado PS3_{AH}TT217. La incorporación de TT funcionó mejor mediante la incorporación de EDAC en 10 minutos, quizás debido a un menor grado de
15 entrecruzamiento, y a un mejor entrecruzamiento entre los grupos hidrazina de los grupos PS3_{AH} y carboxílicos de la proteína.

En el caso del conjugado 218, dado que la derivación de PS3 EDAC solamente deriva parcialmente el polisacárido (para mantener la mayoría de los epítopos polisacáridos intactos), de nuevo están
20 presentes tanto grupos amino como grupos carboxilo reactivos, razón por la cual la adición lenta de EDAC en un paso final de conjugación también es beneficiosa.

La adición lenta de TT en el paso de conjugación final fue beneficiosa (sin embargo) para el conjugado 208 en donde el TT fue
25 derivado con ADH (y contiene grupos amino y grupos carboxilo),

mientras que el PS3 se dejó con sus grupos reactivo naturales -OH y -COOH como parte de su sub unidad de repetición. La adición de EDAC al PS 3 no tuvo el efecto de enlace cruzado anterior, y la adición lenta del TT derivado produjo conjugado con buenas características *in vitro* - véase lo siguiente.

Caracterización *in vitro*:

10	Conj.	Derivación/Química	Conjugación/Química	Adición de componente final
	208	TT/ADH →EDAC	PS-TT _{AH} → EDAC	TT _{AH} añadido en 11 minutos
	215	PS3/ADH → CDAP	PS _{AH} -TT → EDAC	TT añadido en 10 minutos
15	217	PS3/ADH → CDAP	PS _{AH} -TT → EDAC	EDAC añadido en 10 minutos
	218	PS3/ADH → EDAC	PS _{AH} -TT → EDAC	EDAC añadido en 10 minutos

20	Conj.	PS	[PS] (mg/mL)	[TT] (mg/mL)	Proporción In.TT/PS (p/p)	[EDAC] (PS mg/mg)	Tiempo acopl. (min)
	208	C6E02	2.0	10 (TT _{AH}) bomba	1.5/1	0.5/1	120
25	215	3 _{AH} 001 (CDAP)	2.0	10 bomba	1.5/1	0.5/1	120

85

5

217	3 _{AH} 001 (CDAP)	2.0	10	1.5/1	0.5/1 (fracciones)	120
218	3 _{AH} 002 (EDAC)	2.0	10	1.5/1	0.5/1 (fracciones)	120

10

Conj.	F.TT/PS proporción (p/p)	Rendimiento PS rec (%)	Rendimiento filtr. Rec (%)	PS libre (%)	Antigenicidad α PS/ α PS (%)	Antigenicidad α TT/ α PS (%)
208	1.84/1	69	95	10.2	99	103 100*
215	0.50/1	17	27	-	-	-
217	0.98/1	66	100	0.7	17	103 100*
218	0.88/1	74	101	11.0	34	222 216*

15

* con relación al conjugado 208

20

Ejemplo 1c - preparación de conjugado de polisacárido Vi de S typhi de la invención

Ajuste de tamaño por Emulsiflex

Se pesó el PS sobre la base de 15% de contenido teórico de humedad. El PS natural se disuelve durante la noche en WFI a una

25

concentración inicial de 7 mg/ml. Antes del ajuste de tamaño, la

86

solución de PS natural es clarifica en filtro en corte de $10\ \mu\text{m}$ a una velocidad de flujo de 50 ml/min. Se usó un aparato homogenizador Emulsiflex C-50 para reducir el peso molecular y la viscosidad del polisacárido antes del paso de activación. La eficiencia del ajuste de tamaño depende de la presión del circuito, la presión de alimentación del émbolo y del número total de ciclos. Con el fin de mejorar la eficiencia del ajuste de tamaño (y en consecuencia reducir la cantidad total de ciclos), la celda de homogenización de Emulsiflex fue reemplazada por una celda con una geometría fija (Cámara de interacción Microfluidics F20Y- $0.75\ \mu\text{m}$). El objetivo del ajuste de tamaño es reducir el peso molecular y la viscosidad del PS sin una disminución crítica de su antigenicidad.

El ajuste de tamaño se realizó a $103.4 \pm 3.4\ \text{MPa}$ ($15000 \pm 500\ \text{psi}$) y se le hizo seguimiento en proceso mediante una medición de la viscosidad. El ajuste de tamaño se detiene cuando se alcanza el objetivo de $5.0 \pm 0.3\ \text{cp}$.

Filtración de PS ajustado en tamaño en $0.22\ \mu\text{m}$

Se filtra PS ajustado en tamaño en una membrana Millipak 40 (corte $0.22\ \mu\text{m}$) a una velocidad de flujo de 10 ml/min. El PS ajustado en tamaño, filtrado, se almacena a $-20\ ^\circ\text{C}$.

Derivación de polisacárido Vi

Se disolvió 1.5 g de PS Vi a 25°C en EPI bajo agitación (5 mg/ml). Se le añade 13.35 g de ADH (8.9 mg ADH/mg PS) a la solución de PS. Después de disolución completa se ajustó el pH a un pH de 5.0 ± 0.05 con HCl 1 N. Se le añadió EDAC (0.1 mg/mg PS) en

forma sólida. La solución se dejó 60 min a 25°C. Luego se neutralizó la solución mediante la adición de Tris-HCl 1 M con un pH de 7.5 y se dejó al menos 30 min a 25°C (máximo 2 horas). Se estimó que el nivel de derivación es de 4.55% usando la dosis de TNBS (mg ADH/ 100 mg PS). La dosis de TNBS fue de 200 $\mu\text{g/ml}$ y la dosis de PS fue de 4034 $\mu\text{g/ml}$; así, 0.0697 μmoles de ADH / 16.46 μmol de unidad de repetición (PM 245). 1.3 μmoles de ADH / 16.46 μmol de grupo COOH reactivo en Vi, así 7% de grupos COOH Vi fueron grupos COOH modificados con ADH.

10 Diafiltración

Se diafiltró el derivado PSVi_{AH} con el fin de eliminar los subproductos de ADH y EDAC que no reaccionaron. Se realizó la diafiltración en una membrana Centramate (0.09 m², corte 10 kDa). La solución fue dializada contra 20 volúmenes de NaCl 0.2 M. El seguimiento del paso de diafiltración se realizó mediante una cuantificación de ADH (análisis TBNS) en el permeado después de 3, 5, 10 y 20 volúmenes de diafiltración

Filtración en 0.22 μm

Se filtró PSVi_{AH} finalmente en membrana en corte de 0.22 μm (Millipack 40) a una velocidad de flujo de 10 ml/min. El PSVi_{AH} filtrado se almacenó a +2/+8°C durante un máximo de 4 días.

Conjugados PSVU_H-TT

Las condiciones del proceso fueron las siguientes:

Una concentración inicial de PSVi_{AH} de 2 mg/ml en 0.2 M NaCl, una proporción inicial de TT/PSVi_{AH} de 2.5/1 (p/p), una

concentración de EDAC de 0.25 mg/mg PS y una concentración de TT de 10 mg/ml en NaCl 0.2 M.

Se diluyó 1g of PSVi_{AH} se diluyó en NaCl 0.2 M para obtener una concentración final de PS de 2 mg/ml (dosis de ácido urónico).

- 5 La solución TT purificada se diluyó en NaCl 0.2 M hasta alcanzar una concentración de 10 mg/ml.

Se añadió TT a la solución de PSVi_{AH} con el fin de alcanzar una proporción final de 2.5 mg TT/ mg PS. El pH es ajustado a 5.0 ± 0.05 con HCl 1 N. Luego se le añadió la solución de EDAC (7.5 mg/ml en 0.1 M Tris pH 7.5) (en 10 minutos con una bomba peristáltica) hasta alcanzar 0.25 mg EDAC/ mg PSVi_{AH}. Se incubó la solución resultante 50 min a + 25°C con agitación y regulación de pH para obtener un tiempo de acoplamiento final de 60 min. Luego se neutralizó la solución mediante la adición de Tris-HCl 1 M con pH de 7.5 y se dejó 30 min a +25 °C. Se transfirió el conjugado a 4°C y se dejó durante la noche bajo agitación lenta continua antes del paso de cromatografía

Purificación

20 Antes de la elución en Sephacryl S400HR, el conjugado se clarificó usando un filtro Kleenpak de 10 μ m. La velocidad de flujo se fijó en 100 ml/min. Luego se inyectó el conjugado en Sephacryl S400HR y el grupo de recolección se basó en un valor de K_d. Se usaron los siguientes criterios para la recolección del grupo: desde OD= 0.05 a 280 nm comenzó la recolección, y finalizó cuando K_d= 0.22.

25

Filtración por esterilización

Antes de la filtración, el producto en bruto se llevó de nuevo a temperatura ambiente. Luego el conjugado se filtró en una membrana esterilizante Opticap de 10 cm (4"). La velocidad de flujo
5 se fijó en 30 ml/min.

Análisis

El conjugado resultante tuvo una proporción final TT/PS (p/p) de 2.44/1, un contenido de PS libre de 3.7% y una antigenicidad α PS/ α PS de 58%.

10 Ejemplo 1d - preparación de otros conjugados de polisacárido

El enlace covalente del polisacárido PRP de *Haemophilus influenzae* (Hib) con TT se llevó a cabo mediante una química de acoplamiento desarrollada por Chu et al (Infection and Immunity 1983, 40 (1); 245-256). El polisacárido Hib PRP se activó
15 añadiendo CNBr e incubando con un pH de 10.5 durante 6 minutos. Se disminuyó el pH hasta un pH de 8.75 y dihidrazida de ácido adípico (ADH) se añadió y la incubación continuó durante otros 90 minutos. El PRP activado se acopló a un toxoide tetánico purificado por medio de condensación por carbodiimida usando 1-etil-3-(3-
20 dimetil-aminopropil)carbodiimida (EDAC). Se añadió EDAC al PRP activado hasta alcanzar una proporción final de 0.6 mg de EDAC/mg de PRP activado. Se ajustó el pH hasta 5.0 y se le añadió toxoide tetánico purificado hasta alcanzar 2mg de TT/mg de PRP activado. La solución resultante se dejó durante tres días con agitación suave.
25 Después de filtración a través de una membrana de 0.45 μ m, se

purificó el conjugado en una columna Sephacryl S500HR (Pharmacia, Suecia) equilibrada en NaCl 0.2 M.

Se produjeron conjugados MenC-TT usando polisacáridos naturales (de más de 150 kDa medido mediante MALLS) o se
5 microfluidizaron ligeramente. Se produjeron conjugados MenA-TT usando polisacárido natural o polisacárido ligeramente
microfluidizado de más de 60 kDa, medido mediante el método MALLS para el ejemplo 2. Se produjeron conjugados MenW y MenY-TT usando polisacáridos ajustados en tamaño de alrededor de 100-
10 200 kDa medido mediante MALLS (véase el ejemplo 2). El ajuste de tamaño fue por microfluidización usando un aparato homogenizador Emulsiflex C-50. Los polisacáridos se filtraron entonces a través de un filtro de 0.2 μ m.

Se realizó activación y acoplamiento directo según se describe
15 en WO96/29094 y WO 00/56360. Brevemente, el polisacárido en una concentración de 10-20 mg/ml en NaCl 2M con pH 5.5-6.0 se mezcló con solución CDAP (100 mg/ml recién preparada en acetonitrilo/WFI, 50/50) para una proporción final de CDAP/polisacárido de 0.75/1 o 1.5/1. Después de 1.5 minutos, se elevó el pH con hidróxido de sodio
20 hasta un pH de 10.0. Después de tres minutos se le añadió toxoide tetánico hasta alcanzar una proporción proteína/polisacárido de 1.5/1 para MenW, 1.2/1 para MenY, 1.5/1 para MenA o 1.5/1 para MenC. La reacción continuó durante una a dos horas.

Después del paso de acoplamiento, se añadió glicina hasta una
25 proporción final de glicina/PS (p/p) de 7.5/1 y se ajustó el pH hasta

pH9.0. La mezcla se dejó reposar durante 30 minutos. El conjugado se clarificó usando un filtro Kleenpak de 10 μm y luego se cargó en una Columna Sephacryl S400HR usando un amortiguador para elusión de NaCl 150 mM, Tris 10 mM o 5 mM con pH de 7.5. Se
 5 filtraron cantidades clínicas en una Membrana esterilizante Opticap 4. Los conjugados resultantes tuvieron una proporción promedio polisacárido:proteína ratio de 1 :1-1 :5 (p/p).

Ejemplo 2 - Determinación de peso molecular usando MALLS

Se acoplaron detectores a una columna para HPLC por
 10 exclusión de tamaño a partir de la cual fueron eluidas las muestras. Por una parte, el detector de dispersión de luz láser midió las intensidades luminosas dispersadas en 16 ángulos por la solución macromolecular y por otra parte, un refractómetro interferométrico colocado en línea permitió la determinación de la cantidad de
 15 muestra eluida. A partir de estas intensidades, se puede determinar el tamaño y la forma de las macromoléculas en la solución.

El peso molecular (PM) medio en peso se define como la suma de los pesos de todas las muestras multiplicados por su respectivo peso molecular y dividida por la suma de los pesos de todas las
 20 muestras.

a) Peso molecular promedio en peso: -Mw-

$$M_w = \frac{\sum W_i \cdot M_i}{\sum W_i} = \frac{m_2}{m_1}$$

b) Peso molecular promedio en número: -Mn-

25

$$M_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} = \frac{m_1}{m_0}$$

c) Raíz cuadrada media del radio: $-R_w-$ y R^2_w es el radio al cuadrado definido por:

$$R^2_w \text{ o } (r^2)_w = \frac{\sum m_i \cdot r_i^2}{\sum m_i}$$

($-m_i$ es la masa de un centro de dispersión i y $-r_i-$ es la distancia entre el centro de dispersión i y el centro de gravedad de la macromolécula).

10 d) La polidispersidad se define como la proporción $-M_w/M_n-$.

Los polisacáridos meningocócicos fueron analizados mediante MALLS cargándolos en dos columnas para HPLC (TSKG6000 y 5000PWxi) usadas en combinación. Se cargó 25 μ l del polisacárido en la columna, y se eluyó con 0.75 ml de agua filtrada. Los
15 polisacáridos se detectan usando un detector de dispersión de luz (Wyatt Dawn DSP equipado con un láser de argón de 10 PM a 488nm) y un refractómetro interferométrico (Wyatt Otilab DSP equipado con una celda P100 y un filtro rojo a 498nm).

Las polidispersidades del peso molecular y las recuperaciones
20 de todas las muestras fueron calculadas mediante el método Debye usando un orden de ajuste polinomial de 1 en el software Astra 4.72.

Ejemplo 3 - Prueba clínica para evaluar el efecto de un enlazante en MenA en una vacuna de conjugado MenACWY

Se administró una sola dosis de diferentes formulaciones de
25 vacunas MenACWY a adolescentes de 15-19 años en 5 grupos de 25

sujetos en una prueba aleatoria 1:1:1:1:1. Las formulaciones sometidas a prueba fueron:

F1 - Conjugado MenACWY con toxoide tetánico con el conjugado MenA que contiene un separador AH(ADH) (elaborado de acuerdo con el ejemplo 1) - 5/5/5/5 µg

F2 - Conjugado MenACWY con toxoide tetánico con el conjugado MenA que contiene un separador AH (elaborado de acuerdo con el ejemplo 1) - 2.5/5/2.5/2.5 µg

F3 - Conjugado MenACWY con toxoide tetánico con el conjugado MenA que contiene un separador AH (elaborado de acuerdo con el ejemplo 1) - 5/5/2.5/2.5 µg

F4 - Conjugado MenACWY con toxoide tetánico sin separador en ningún conjugado - 5/5/5/5 µg

Grupo control - Mencevax™ ACWY

El día 30 después de la inoculación, se le tomó una muestra de sangre a los pacientes.

Se usaron las muestras de sangre para evaluar el porcentaje de SBA-MenA, SBA-MenC, SBA- MenW135 y SBA-MenY respondedores un mes después de la dosis de vacuna. Una respuesta a la vacuna se definió como 1) para sujetos inicialmente seronegativos - un título de anticuerpo posterior a la vacunación > 1/32 a 1 mes o 2) para sujetos inicialmente seropositivos - título de anticuerpo de > 4 veces el título de anticuerpo antes de la vacunación.

25 **Resultados**

Como se muestra en la Tabla siguiente, el uso de un separador en el conjugado MenA condujo a una respuesta inmunitaria aumentada contra MenA. El porcentaje de respondedores aumentó desde 66% hasta 90-95% cuando se añadió el separador AH. Esto se reflejó en un aumento en GMT SBA desde 4335 hasta 10000 y un aumento en GMC desde 5 hasta 20-40. Sorprendentemente, el uso de un separador AH también condujo a una respuesta inmunitaria aumentada contra MenC como se observa mediante un aumento en el porcentaje de respondedores y un aumento en GMT SBA. También se pudo observar un aumento en SBA-GMT contra MenY (6742-7122) y contra MenW (4621-5418) cuando se introdujo un separador.

15	Formulación	% deMenA SBA respondedores	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC µg/mL ELISA
	F1 _{5AH/5/5/5}	90.9	9805	20.38
	F2 _{2.5AH/5/2.5/2.5}	75	8517	29.5
	F3 _{5AH/5/2.5/2.5}	95.5	10290	47.83
	F4 _{5/5/5/5}	66.7	4335	5.46
20	Mencevax ^{lm}	85.7	8022	27.39
	Formulación	% deMenA SBA respondedores	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC µg/mL ELISA
	F1 _{5AH/5/5/5}	69.6	3989	12.11
	F2 _{2.5AH/5/2.5/2.5}	81.8	3524	12.78
25	F3 _{5AH/5/2.5/2.5}	81.8	3608	8.4
	F4 _{5/5/5/5}	73.9	2391	8.84

5	Mencevax tm	90.0	5447	38.71
	Formulación	% deMenA SBA respondedores	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC µg/mL ELISA
	F1 _{5AH/5/5/5}	95	5418	9.65
	F2 _{2.5AH/5/2.5/2.5}	85	4469	14.55
10	F3 _{5AH/5/2.5/2.5}	95.5	4257	6.39
	F4 _{5/5/5/5}	95.5	4621	10.7
	Mencevax tm	86.4	2714	13.57
	Formulación	% deMenA SBA respondedores	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC µg/mL ELISA
15	F1 _{5AH/5/5/5}	91.3	7122	16.3
	F2 _{2.5AH/5/2.5/2.5}	87.5	5755	12.52
	F3 _{5AH/5/2.5/2.5}	80	5928	8.88
	F4 _{5/5/5/5}	91.3	6742	13.88
	Mencevax tm	91.7	4854	21.02
20				

Ejemplo 4 - Prueba clínica para evaluar el efecto de un enlazante en Conjugados MenA y MenC en una vacuna de conjugado MenACWY

Una sola dosis de diferentes formulaciones de Vacuna
25 MenACWY se le administró a adolescentes de 15-19 años en 5

96

grupos de 25 sujetos en una prueba aleatoria 1:1:1:1:1. Las formulaciones sometidas a prueba fueron:

F1 - Conjugado MenACWY con toxoide tetánico con los conjugados MenA y MenC que contienen un separador AH (elaborado de acuerdo con el ejemplo 1) - 2.5/2.5/2.5/2.5 μ g

F2 - Conjugado MenACWY con toxoide tetánico con los conjugados MenA y MenC que contienen un separador AH (elaborado de acuerdo con el ejemplo 1) - 5/5/2.5/2.5 μ g

F3 - Conjugado MenACWY con toxoide tetánico con los conjugados MenA y MenC que contienen un separador AH (elaborado de acuerdo con el ejemplo 1) - 5/5/5/5 μ g

F4 - Conjugado MenACWY con toxoide tetánico con el conjugado MenA que contiene un separador AH (elaborado de acuerdo con el ejemplo 1) - 5/5/5/5 μ g

Grupo control - ACWY Mencevax™

El día 30 después de la inoculación, se le tomó una muestra de sangre a los pacientes.

Se usaron las muestras de sangre para evaluar el porcentaje de respondedores SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW135 y SBA-MenY un mes después de la dosis de vacuna. Una respuesta a la vacuna se definió como 1) para sujetos inicialmente seronegativos - un título de anticuerpo posterior a la vacunación $> 1/32$ a 1 mes o 2) para sujetos inicialmente seropositivos - título de anticuerpo de > 4 veces el título de anticuerpo antes de la vacunación.

Resultados

La introducción de un AH separador en el conjugado MenC condujo a un aumento en la respuesta inmunitaria contra MenC como se muestra en la Tabla siguiente. Esto se demuestra por un aumento en GMT SBA desde 1943 hasta 4329 y un aumento en GMC anti PSC de 7.65 hasta 13.13. Las buenas respuestas inmunitarias contra MenA, MenW y MenY se mantuvieron.

10	Formulación	% deMenA SBA respondedores	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC µg/mL ELISA
	F1 _{2.5AH/2.5AH/2.5/2.5}	75	8417	20.23
	F2 _{5AH/5AH/2.5/2.5}	72	6299	16.07
	F3 _{5AH/5AH/5/5}	87	9264	27.26
	F4 _{5AH/5/5/5}	77.3	9632	20.39
15	Mencevax tm	78.3	8284	12.93
	Formulación	% deMenA SBA respondedores	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC µg/mL ELISA
	F1 _{2.5AH/2.5AH/2.5/2.5}	88	3619	12.82
	F2 _{5AH/5AH/2.5/2.5}	88	2833	13.32
20	F3 _{5AH/5AH/5/5}	95.8	4329	13.13
	F4 _{5AH/5/5/5}	95.8	1943	7.65
	Mencevax tm	91.7	1567	16.55
	Formulación	% deMenA SBA respondedores	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC µg/mL ELISA
25	F1 _{2.5AH/2.5AH/2.5/2.5}	100	5656	7
	F2 _{5AH/5AH/2.5/2.5}	96	4679	5.4

5	F3 _{5AH/5AH/5/5}	91.3	4422	4.45
	F4 _{5AH/5/5/5}	88	4947	7.67
	Mencevax tm	96	3486	11.93
10	Formulación	% deMenA SBA respondedores	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC µg/mL ELISA
	F1 _{2.5AH/2.5AH/2.5/2.5}	75	3891	17.81
	F2 _{5AH/5AH/2.5/2.5}	92	3968	11.96
	F3 _{5AH/5AH/5/5}	79.2	2756	9.51
	F4 _{5AH/5/5/5}	80	3914	16.76
	Mencevax tm	88	3056	21.41

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para conjugar un sacárido con un portador
proteína usando química de condensación por carbodiimida,
5 caracterizado porque el sacárido contiene (por ejemplo como parte
de su unidad de repetición), o ha sido derivado para que contenga,
grupos amino y/o grupos carboxilo, y caracterizado además porque el
portador proteína contiene, o ha sido derivado para que contenga,
grupos grupos amino y/o grupos carboxilo, el método comprende los
10 pasos de:

I) - si el portador proteína contiene tanto grupos amino como
grupos carboxilo y el sacárido contiene ya sea grupos amino o
grupos carboxilo:

a) mezclar el sacárido y la alícuota de carbodiimida requerida
15 para realizar la conjugación, y

b) añadir la alícuota de portador proteína requerida durante un
periodo de 35 segundos hasta 6 horas;

II) - si el sacárido contiene tanto grupos amino como grupos
carboxilo y el portador proteína contiene ya sea grupos amino o
20 grupos carboxilo:

a) mezclar el portador proteína y la alícuota de carbodiimida
requerida para realizar la conjugación, y

b) añadir la alícuota de sacárido requerida durante un periodo
de 35 segundos hasta 6 horas;

25 III) - si el sacárido contiene tanto grupos amino como grupos

carboxilo y el portador proteína contiene tanto grupos amino como grupos carboxilo:

a) mezclar el portador proteína y el sacárido, y

b) añadir la alícuota de carbodiimida requerida para realizar la
5 conjugación durante un periodo de 35 segundos hasta 6 horas.

2. El método de la reivindicación 1, caracterizado además porque en el paso b) el periodo es desde 50 segundos hasta 5 horas, desde 1 minuto hasta 4 horas, desde 2 minutos hasta 3 horas, desde 3 minutos hasta 2 horas, desde 4 hasta 60 minutos, desde 5 hasta 50
10 minutos, desde 6 hasta 40 minutos, desde 7 hasta 30 minutos o desde 8 hasta 20 minutos.

3. El método de la reivindicación 1, caracterizado además porque en el paso b) el periodo es desde 1 minuto hasta 5 horas, desde 10 minutos hasta 4 horas, desde 20 minutos hasta 3 horas,
15 desde 30 minutos hasta 2 horas, desde 40 hasta 90 minutos, o desde 50 hasta 70 minutos.

4. El método de las reivindicaciones 1-3, caracterizado además porque la carbodiimida es EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida) o una carbodiimida distinta de EDAC.

20 5. El método de las reivindicaciones 1-4, caracterizado además porque la alícuota de carbodiimida requerida para realizar la conjugación es desde 0.01 hasta 3, desde 0.05 hasta 2 o desde 0.09 hasta 1 mg/mg de sacárido.

6. El método de las reivindicaciones 1-5, caracterizado
25 además porque el sacárido y/o portador proteína ha sido derivado

para que contenga grupos amino o carboxilo.

7. El método de la reivindicación 6, caracterizado además porque la derivación se lleva a cabo mediante la adición de un enlazante hetero- u homo-bifuncional.

5 8. El método de la reivindicación 7, caracterizado además porque el enlazante tiene entre 4 y 12 átomos de carbono.

9. El método de la reivindicación 7 u 8, caracterizado además porque el enlazante tiene dos grupos amino reactivos.

10 10. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 7-9 caracterizada además porque el enlazante es ADH.

11. El método de la reivindicación 7 u 8, caracterizado además porque el enlazante tiene dos grupos reactivos ácido carboxílico.

15 12. El método de la reivindicación 7 u 8, caracterizado además porque el enlazante tiene un grupo amino reactivo en un extremo y un grupo reactivo ácido carboxílico en el otro extremo.

20 13. El método de las reivindicaciones 7-12, caracterizado además porque la derivación tiene lugar haciendo reaccionar un exceso grande de enlazante con el sacárido y/o portador proteína que va a ser derivado.

14. El método de las reivindicaciones 7-13, caracterizado además porque el sacárido contiene un grupo hidroxilo reactivo como parte de su unidad de repetición, el cual está derivado parcialmente por medio de un grupo amino en el enlazante.

15. El método de la reivindicación 14, caracterizado además porque el sacárido es derivado parcialmente con química CDAP.

16. El método de las reivindicaciones 7-13, caracterizado además porque el sacárido incluye un grupo amino reactivo como
5 parte de su unidad de repetición, el cual está derivado parcialmente por medio de un grupo carboxilo en el enlazante.

17. El método de la reivindicación 16, caracterizado además porque el sacárido es derivado parcialmente con química de condensación por carbodiimida.

10 18. El método de las reivindicaciones 7-13, caracterizado además porque el sacárido incluye un grupo carboxilo reactivo como parte de su unidad de repetición, el cual está derivado parcialmente por medio de un grupo amino en el enlazante.

15 19. El método de la reivindicación 18, caracterizado además porque el sacárido es derivado parcialmente con química con carbodiimida.

20 20. El método de las reivindicaciones 1-19, caracterizado además porque en el paso b) la alícuota de carbodiimida, sacárido o portador proteína se añade a una velocidad constante usando una bomba.

21. El método de las reivindicaciones 1-19, caracterizado además porque en el paso b) la alícuota de carbodiimida, sacárido o portador proteína se añade por etapas durante el periodo.

25 22. El método de la reivindicación 21, caracterizado además porque al menos un cuarto de la alícuota se añade durante la

primera mitad del periodo, y al menos un cuarto de la alícuota durante la segunda mitad del periodo.

23. El método de la reivindicación 21 o 22, caracterizado además porque la alícuota "a" se añade en 4-100 etapas "s".

5 24. El método de la reivindicación 23, caracterizado además porque a/s de la alícuota se añade en cada etapa.

25. El método de la reivindicación 23 o 24, caracterizado además porque si una etapa tiene lugar en el momento cero del periodo "p", cada etapa subsiguiente tiene lugar en un momento que
10 es $p/(s-1)$.

26. El método de las reivindicaciones 1-25, caracterizado además porque el sacárido está presente en una concentración final de 0.5-50 mg/ml en el paso b).

27. El método de las reivindicaciones 1-26, caracterizado
15 además porque la proporción inicial de portador proteína respecto un sacárido es desde 5:1 hasta 1:5, desde 4:1 hasta 1:1, o desde 3:1 hasta 2:1 (p/p).

28. El método de las reivindicaciones 1-27, caracterizado además porque la concentración de sal, por ejemplo NaCl, presente
20 en el paso b) es de 0-2, 0.1-1 o 0.2-0.5 M.

29. El método de las reivindicaciones 1-28, caracterizado además porque el portador proteína está presente en una concentración final de 1-50 mg/ml en el paso b).

30. El método de las reivindicaciones 1-29, caracterizado
25 además porque el pH de la reacción en el paso b) se mantiene en un

pH de 4.5-6.5, 4.7-6.0, o 5-5.5.

31. El método de las reivindicaciones 1-29, caracterizado además porque N-hidroxisuccinimida también está presente en la reacción en el paso b), y el pH de la reacción en el paso b) se
5 mantiene en 4.5-7.5.

32. El método de las reivindicaciones 1-31, caracterizado además porque la temperatura de la reacción en el paso b) se mantiene a 4-37, 10-32, 17-30, o 22-27 °C.

33. El método de las reivindicaciones 1-32, caracterizado
10 además porque después de que la alícuota ha sido añadida toda en el paso b) la reacción se mantiene por otros 10 minutos hasta 72 horas, 20 minutos hasta 48 horas, 30 minutos hasta 24 horas, 40 minutos hasta 12 horas, 50 minutos hasta 6 horas, o 1-3 horas.

34. El método de las reivindicaciones 1-33, caracterizado
15 además porque una vez que está terminada la reacción el pH es ajustado a 7.5-9.

35. El método de las reivindicaciones 1-34, que además comprende un paso subsiguiente c), en donde el conjugado sacárido-proteína es purificado en una columna para cromatografía por
20 exclusión de tamaño.

36. El método de las reivindicaciones 1-35, que además comprende un paso subsiguiente d), caracterizado además porque el conjugado sacárido-proteína es filtrado de manera estéril.

37. El método de las reivindicaciones 1-36, que comprende
25 un paso subsiguiente e), caracterizado además porque una dosis

efectiva del conjugado sacárido-proteína se formula con un excipiente aceptable farmacéuticamente para fabricar una composición inmunogénica o vacuna.

38. El método de las reivindicaciones 1-37, caracterizado
 5 además porque el sacárido es un sacárido capsular bacteriano, por ejemplo derivado de una bacteria seleccionada de una lista que consiste en: *N. meningitidis* serogrupo A, B, C, W135 o Y, *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F o 33F,
 10 *Streptococcus* Grupo B, grupo Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, o VII, *Staphylococcus aureus* tipo 5, *Staphylococcus aureus* tipo 8, *Salmonella typhi* (sacárido Vi), *Vibrio cholerae*, o *H. influenzae* tipo b.

39. El método de las reivindicaciones 1-38, caracterizado
 15 además porque el peso molecular promedio en peso del sacárido es 1000-2000000, 5000-1000000, 10000-500000, 50000-400000, 75000-300000, o 100000-200000.

40. El método de las reivindicaciones 1-39, caracterizado
 además porque el sacárido es un polisacárido natural o está
 20 dimensionado por un factor de no más de x10 (por ejemplo mediante microfluidización).

41. El método de las reivindicaciones 1-37, caracterizado
 además porque el sacárido es un lipooligosacárido o lipopolisacárido bacteriano, por ejemplo derivado de una bacteria seleccionada de
 25 una lista que consiste en: *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *E. coli*,

Salmonella o *M. catarrhalis*.

42. El método de las reivindicaciones 1-41, caracterizado además porque el portador proteína contiene uno o más epítopos T auxiliares.

5 43. El método de las reivindicaciones 1-42, caracterizado además porque el portador proteína se selecciona del grupo que consiste en: TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, proteína D de *H. influenzae*, PhtD neumocócico, y neumolisina neumocócica.

44. Un conjugado de sacárido-portador que se puede obtener
10 mediante el método de las reivindicaciones 1-43.

45. Una composición inmunogénica o vacuna que se puede obtener mediante el método de las reivindicaciones 1-43.

46. Uso de la composición inmunogénica o vacuna de la reivindicación 44 en la fabricación de un medicamento para la
15 prevención o tratamiento de una enfermedad.

47. Método para prevenir o tratar una enfermedad que comprende el paso de administrar una dosis efectiva de la composición inmunogénica o vacuna de la reivindicación 45 a un paciente que necesita de ello.

20 48. El uso o método de la reivindicación 45 o 46, caracterizado además porque la enfermedad es causada por una bacteria seleccionada de una lista que consiste en: *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *M. catarrhalis*, Grupo B *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, y
25 *H. influenzae*.

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 43
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

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

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

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

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha_



No. 07-136721- -00000-0000

Fecha: 2007-12-27 16:15:53 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 107

rrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia