

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-136747- -00009-0000

Fecha: 2012-11-29 17:14:23

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALII

Act. 412 REPOSPRESRECU

Folios: 139

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: PI.-GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.-Solicitud de Patente de Invención para "VACUNA DE CONJUGADOS DE SACÁRIDOS DE NEISSERIA MENINGITIDIS".-Clase A61K 39/095.-Expediente número 07-136.747.-

Yo, **ALICIA LLORED A RICAURTE**, mayor, vecina de esta ciudad, identificada con la cédula de ciudadanía número 39.690.713 de Usaquén, Representante Legal en Bogotá para todos los asuntos relacionados con la Propiedad Industrial de la sociedad **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica y domiciliada en Rixensart, Bélgica, atentamente manifiesto a usted que interpongo **Recurso de Reposición** contra la Resolución Número **61144** dictada por el señor Superintendente de Industria y Comercio el 19 de Octubre de 2012 y notificada por Edicto fijado el 23 de Octubre de 2012, por medio de la cual se niega el privilegio de patente solicitado para la invención contenida en el expediente de la referencia, con base en lo siguiente.

I. FUNDAMENTOS DE DERECHO

Como fundamento de mi recurso me permito manifestar ante ese Despacho que el contenido de la Resolución Número **61144** evidencia que durante el examen técnico realizado a la solicitud en cuestión de ninguna manera se consideró el alcance, objeto e importancia de la invención denegada en su verdadera dimensión, esto es, no se consideró el valioso aporte técnico que representa para el arte en cuestión las composiciones inmunogénicas que son reveladas en la solicitud denegada.

En efecto, a pesar de los argumentos proporcionados por el solicitante en respuesta al Concepto Técnico notificado por ese Despacho el 20 de Junio de 2012, en la Resolución impugnada este Despacho sostiene una serie de objeciones frente al nivel inventivo de la solicitud, argumentando básicamente que:

"...la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría ésta característica del documento D2, el cual enseña que los sacáridos pueden estar conjugados a la proteína portadora directamente o a través de un enlazante, a las composiciones del documento D1 para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera que no presenta nivel inventivo";

Así como también que:

"...la persona del oficio normalmente versada en la materia, que conoce por los documentos D3 y D2 que los sacáridos de N. meningitidis pueden ser conjugados con la proteína portadora usando CDAP ya sea directamente o a través de un enlazante, se vería motivada a diseñar kits que comprendan conjugados de N. meningitidis, cuya conjugación se realice de forma directa o a través de un enlazante y conjugados de Hib, toxoide de tétanos, toxoide de difteria y componentes de tosferina de célula enteras o acelulares como lo revela el documento D3, con la expectativa razonable de obtener un kit inmunogénico. Por lo tanto, ante la falta de ensayos que demuestren una ventaja inesperada del kit reclamado se considera que éste se deriva de lo revelado previamente en el estado de la técnica y no presenta nivel inventivo".

Por consiguiente, a continuación me permito demostrar ante ese Despacho que la presente invención sí cumple con el nivel inventivo exigido por el Artículo 18 de la Decisión 486 de 2000, toda vez que a partir de las enseñanzas del estado de la técnica anterior de ninguna manera resultaba evidente que procesos de conjugación específicos para cada conjugado dentro de una mezcla de conjugados de N. Meningitidis permita lograr una respuesta inmune con mayor balance entre los conjugados meningocócicos individuales, tal y como ha sido demostrado por el solicitante de la invención en cuestión.

1. PRESENTACIÓN DE SOLICITUD DIVISIONAL

(a) Inicialmente y de conformidad con el Artículo 36 de la Decisión Andina 486 de 2000, el Artículo 7 del Decreto 2591 de 13 de Diciembre de 2000 y el Artículo 11 de la Resolución Número 00210 de 15 de Enero de 2001, me permito manifestar que **la presente solicitud de patente se ha dividido en dos solicitudes**, a saber:

- (i) Una solicitud original compuesta por 11 reivindicaciones, las cuales corresponden a las reivindicaciones 1 a 5 y 11 a 16 actualmente presentadas con la solicitud de patente número **07-136.747**.

- (ii) Una solicitud fraccionada número **07-136.747A**, la cual comprende 26 reivindicaciones que encuentran pleno sustento en el capítulo reivindicatorio presentado ante ese Despacho junto con mi memorial de 5 de Febrero de 2008.

(b) En conexión con lo anterior, a continuación especifico los documentos anexos al presente memorial y que se relacionan con cada una de las solicitudes resultantes del presente fraccionamiento:

(i) **Solicitud original: "VACUNA DE CONJUGADOS DE SACÁRIDOS DE NEISSERIA MENINGITIDIS"**

- Recibo número 12-0097817, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago por la reivindicación 11; y
- Nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 11 reivindicaciones.

(ii) **Solicitud Divisional A: "VACUNA DE CONJUGADOS DE SACÁRIDOS DE NEISSERIA MENINGITIDIS".**

- Recibo número 12-108169, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de los derechos que causa el presente fraccionamiento;
- Recibos números 12-108169, 12-117227 y 109968 expedidos por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago por las reivindicaciones 11 a 26;
- Nuevo resumen-Objeto y Finalidad de la Invención;
- Páginas 2 a 98 de la descripción, que corresponden al texto de la descripción de la solicitud de patente número **07-136.747** originalmente presentada;
- Páginas 99-105 que corresponde al nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 26 reivindicaciones que, como se comentó previamente, encuentran pleno sustento en el capítulo reivindicatorio presentado ante ese Despacho junto con mi memorial de 5 de Febrero de 2008;

- Figura 1;
- Extracto de la solicitud, en sus dos formas, que incluye el título que se encuentra de acuerdo con el objeto de la presente invención fraccionada y que incluye la reivindicación 1;
- Tarjeta de propietario;
- Fotocopia del documento que acredita el traspaso de los derechos de la presente invención que los autores de dicho invento hacen a favor de mi representado, junto con la Traducción Oficial;
- Fotocopia del documento que acredita a la suscrita ALICIA LLOREDA y/o al doctor GUSTAVO TAMAYO, y/o a la doctor IGNACIO SANTAMARIA y/o a al doctor ENRIQUE ALVAREZ, en los términos del Párrafo 1º del Artículo 543 del Decreto-Ley 410 de 1971, como Representantes Legales en Bogotá para todos los asuntos relacionados con la Propiedad Industrial de la sociedad **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica y domiciliada en Rixensart, Bélgica; y
- Formato Único de Conversión, División y Fusión de Solicitudes.

(c) Como la fecha de presentación de la solicitud resultante del presente fraccionamiento es la misma --**27 de Diciembre de 2007**--, atentamente solicito a usted se sirva dar a la solicitud fraccionada el mismo número de Expediente de la solicitud original, acompañada de la letra **A**, para su identificación.

(d) En cuanto a la reivindicación de la prioridad respecto de la solicitud divisional, es la misma invocada en la solicitud original, la cual fue reivindicada oportunamente en Fase Internacional de las solicitudes números 0513069.5 y 0513071.1 de 27 de Junio de 2005; 0515556.9 de 28 de Julio de 2005; 0524204.5 de 28 de Noviembre de 2005; 0526040.1 y 0526041.9 de 21 de Diciembre de 2005.

(e) Ratifico a usted que la sociedad titular de la solicitud fraccionada en cuestión es **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS.**, organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica y domiciliada en Rixensart, Bélgica.

(f) Así mismo, reitero a usted que el documento que acredita mi calidad de Representante Legal en dicha sociedad para todos los asuntos de la Propiedad Industrial, fue presentado con mi petitorio de **27 de Diciembre de 2007**.

(g) De conformidad con lo establecido por el Artículo 36 de la Decisión 486 de 2000, solicito a ese Despacho se sirva aceptar y estudiar la solicitud divisional presentada y conceder el privilegio de patente solicitado.

2. CONSIDERACIONES TÉCNICAS FRENTE A LAS ENSEÑANZAS DEL ARTE PREVIO

Ahora bien, atentamente me permito manifestar ante ese Despacho que las composiciones inmunogénicas reveladas en la solicitud de patente en cuestión presentan un inequívoco carácter inventivo con respecto a las enseñanzas de las anterioridades mencionadas en la Resolución Número **61144**, esto es, frente a la combinación de los documentos **WO 2004/103400 (D1)**, **WO 03/007985 (D2)** y **WO 2002/000249 (D3)**. En este sentido, a continuación me permito realizar un análisis comparativo detallado entre la información revelada en la presente invención y las enseñanzas brindadas por dichas anterioridades, no sin antes mencionar una serie de consideraciones frente al requisito de nivel inventivo establecidas en el artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000.

2.1. Requisitos exigidos por el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000: Consideraciones frente al estudio del nivel inventivo

Inicialmente considero de gran importancia resaltar que el artículo 18 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina establece lo siguiente en relación con el requisito de nivel inventivo que debe cumplir una solicitud de patente:

"Artículo 18.- Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica."

A éste respecto, resulta de gran importancia señalar que la apreciación del nivel inventivo -por su gran contenido de subjetividad- puede resultar muchas veces incierta o inexacta, lo cual puede llevar a confusiones y excesos. Por lo tanto, para evitar caer en lo anterior, al realizar la apreciación de nivel inventivo es necesario que el experto en la materia base su examen en una apreciación objetiva, teniendo

en cuenta la realidad y circunstancias determinadas al momento en que surgió la invención y sin incluir en dicha apreciación factores meramente subjetivos.

En este sentido, considero relevante destacar que para realizar un verdadero juicio sobre el nivel inventivo de una invención es necesario ubicarse en el momento en que se realizó dicha invención, razón por la cual el experto encargado del caso debe retrotraerse al estado de la técnica existente en dicho momento y analizar desde esa óptica si para ese instante verdaderamente hubiera sido realmente posible llegar de manera obvia o evidente al objeto que se reivindica en una invención. Lo anterior para no caer en el error de comprender, analizar y juzgar una invención después de que ésta ha sido realizada, algo que en el ámbito mundial de las patentes se denomina un análisis de tipo "hindsight". Esta posición errónea es contemplada, por ejemplo, en el Manual Andino de Patentes, donde se establece que: *"se debe tener en cuenta que la búsqueda de anterioridades se efectúa a posteriori, tomando como punto de partida la misma invención. Por lo tanto el examinador debe realizar el esfuerzo intelectual de colocarse en la situación que ha tenido que afrontar el técnico con conocimientos medios en la materia en un momento en que la invención no era conocida, es decir, antes de la invención."*

De otro lado, atentamente me permito citar al profesor Paul Mathely*, quien señala que la altura inventiva de un invento es un concepto relativo que depende en gran parte del grado de habilidad de la persona ejecutante de la invención. Por lo tanto, para una cierta parte de la doctrina mundial, la altura inventiva puede ser confirmada mediante ciertos índices exteriores, entre los cuales puede destacarse aquel que corresponde al progreso o aporte técnico que pueda suministrar la invención al estado de la técnica, de tal suerte que se considera que una invención tiene altura inventiva si dicha invención representa un avance para el estado de la técnica.

2.2. Consideraciones técnicas generales frente a los documentos D1, D2 y D3

En la Resolución Número **61144** se menciona que los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulgan composiciones inmunogénicas que contienen dos o más sacáridos capsulares de N. Meningitidis conjugados con una proteína portadora, mientras que los documentos D2 y D3 constituyen el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 15 (nueva reivindicación 10) porque dan a conocer composiciones inmunogénicas que contienen sacáridos

* MATHELY Paul. Le droit français des brevets d'invention; Paris: Journal des notaires et des avocats, 1978; p. 125.

conjugados de *N. meningitidis*, un sacárido conjugado de Hib y antígenos de B. Pertussis, C. tetani, C. diphtheriae, entre otros.

Con respecto a lo anterior considero de gran importancia aclarar ante ese Despacho lo siguiente:

(a) La reivindicación 1 de la solicitud de patente en cuestión se encuentra dirigida a proteger lo siguiente:

"1. Una composición inmunogénica, la cual comprende dos, tres o cuatro sacáridos capsulares de N. meningitidis diferentes, en donde uno o más se seleccionan a partir de un primer grupo que consiste en MenA, MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan a través de un enlazante bifuncional con una proteína portadora, y uno o más sacáridos diferentes se seleccionan a partir de un segundo grupo que consiste en MenA, MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan directamente con proteína(s) portadora(s), donde cada sacárido capsular de N. Meningitidis está conjugado a toxoide de tétanos (TT) y donde cada sacárido capsular de N. meningitidis está conjugado separadamente a una proteína portadora separada."

(b) En efecto, la presente invención está basada en el principio de que para la conjugación de antígenos de sacáridos débiles debe emplearse un enlazante con el objetivo de mejorar su inmunogenicidad, mientras que los antígenos de sacáridos fuertes deben ser conjugados directamente.

Ahora bien, para el caso en cuestión el solicitante ha identificado a MenA como el antígeno de sacárido más débil y a MenC como el segundo antígeno de sacárido más débil, razón por la cual en la nueva reivindicación 1 se especifica que uno o más de los antígenos débiles (MenA y MenC) son conjugados mediante un enlazante, mientras que los antígenos fuertes (MenC, MenW y MenY) deben ser conjugados directamente. En éste punto resulta de gran importancia resaltar que MenC se mantiene en ambos grupos debido a que en el Ejemplo 8 de la presente invención MenA es conjugado a través de un enlazante mientras que menC es conjugado directamente, pero en el Ejemplo 9 de la presente invención MenC también actúa como un antígeno débil y por lo tanto también es enlazado mediante un enlazante. Lo anterior representa importantes beneficios debido al balance de la respuesta inmune que puede lograrse en ambos escenarios.

(c) De manera específica me permito señalar que en el Ejemplo 8 revelado en la descripción de la solicitud de patente en cuestión, el efecto de conjuguar MenA por medio de un enlazante es investigado utilizando una serie de pruebas clínicas, cuyos

resultados son mostrados en la Tabla 12 de la descripción y demuestran que la adición del enlazante AH en F1 tiene un efecto favorable sobre MenA en el contexto de una vacuna de combinación que contiene los conjugados de MenA, MenC, MenW y MenY. En efecto, el porcentaje de respondientes a SBA aumenta de 66,7% a 90,9% con la introducción del enlazante, lo cual a su vez también se refleja en mayores valores SBA GTM (4335 aumenta a 9805) y en las lecturas de ELISA GMC (donde de 5,46 aumenta hasta 20,38). Sin embargo, las respuestas contra MenC, MenW y MenY se mantienen similares en F1 y F4, demostrando que los demás conjugados no son afectados adversamente por el cambio en el conjugado de MenA.

Por su parte, a través del Ejemplo 9 se investigó el efecto de conjugar MenA y MenC mediante un enlazante, al mismo tiempo que la conjugación de MenW y MenY se realiza directamente. Los resultados de las pruebas realizadas demostraron que la respuesta a MenA es similar a la respuesta lograda en el Ejemplo 8, y que la respuesta inmune a MenC es mejorada con la adición del enlazante a dicho conjugado, toda vez que el porcentaje de respondientes aumentó hasta 95,8% para F3 en comparación con 69,6% para F1 en el Ejemplo 8. Por su parte, la respuesta inmune contra los antígenos fuertes MenW y menY no se ve afectada adversamente durante las pruebas clínicas realizadas.

(d) Ahora bien, en efecto los documentos D1 y D2 pueden ser considerados como el estado de la técnica más cercano debido a que ambos divulgan composiciones inmunogénicas que comprenden combinaciones de MenA, MenC, MenW y/o MenY, los cuales son conjugados mediante un enlazante a una proteína portadora. Sin embargo, es claro que ninguna de tales anterioridades divulga una combinación de conjugados en donde algunos son conjugados mediante un enlazante a la proteína portadora y otros son conjugados directamente a la proteína portadora (Lo anterior es evidente al tener en cuenta que en los ejemplos enseñados en los documentos D1 y D2 se emplean procesos de conjugación muy similares para cada uno de los conjugados MenA, MenC, MenW y MenY (páginas 21 a 25 de D1 y páginas 15 a 18 de D2)). De hecho, a partir de la atenta lectura de los documentos D1 y D2 es claro que ninguna de dichas anterioridades enseña o sugiere qué conjugados deben ser conjugados a través de qué método en particular.

Pese a lo anterior, de acuerdo con lo establecido en la Resolución impugnada en la página 12 (líneas 3 a 9) de D1 se indica que la conjugación directa podría ser una alternativa de conjugación, desconociendo que dicho párrafo en D1 se refiere a la posibilidad de que todos las conjugaciones se lleven a cabo empleando dicho proceso alternativo, pero de ninguna manera sugiere que algunos procesos de conjugación sean realizados empleando un enlazante y otros procesos de conjugación a la proteína portadora se realicen directamente. Así mismo, en D1 no se enseña y

tampoco se sugiere cuáles conjugados meningocócicos deben ser conjugados empleando un enlazante y cuáles deben ser conjugados directamente. Contrario a esto, me permito señalar una vez más ante ese Despacho que en la reivindicación 1 de la solicitud en cuestión se especifica que MenA debe ser conjugado empleando un enlazante, MenW y MenY deben ser conjugados directamente, mientras que menC puede ser conjugado directamente o a través de un enlazante.

Por su parte, en la Resolución impugnada también afirma que en la página 4 del documento D2 se establece que la conjugación puede ser directa empleando conjugación CDAP. Sin embargo, a partir de la atenta lectura de dicha anterioridad es claro que allí no se enseña o se sugiere una composición en la que se empleen procesos diferentes para obtener conjugados diferentes, y por lo tanto tampoco hay alguna indicación o sugerencia de que la conjugación mediante un enlazante deba emplearse para MenA, la conjugación directa deba emplearse para MenW y MenY, mientras que MenC pueda conjugarse indistintamente por ambos métodos.

(e) En relación con lo planteado en el punto anterior, considero de gran importancia señalar que la selección de diferentes métodos de conjugación para antígenos diferentes no habría sido evidente para la persona medianamente versada en la materia a partir de las enseñanzas de los documentos D1 y D2 debido a que en ambas anterioridades es clara la indicación de emplear el mismo método de conjugación para todos los conjugados, y por lo tanto no se hace alusión a que una variación en el proceso de conjugación podría implicar importantes ventajas en el balance inmunogénico de la composición combinada.

(f) En vista de lo anterior, considero de gran importancia resaltar ante ese Despacho que, contrario a lo afirmado en la Resolución Número **61144** aquí impugnada, las composiciones inmunogénicas reveladas en la solicitud de patente en cuestión de ninguna manera corresponden a una simple alternativa de las composiciones inmunogénicas conocidas en el arte previo, pues contrario a esto, el solicitante ha demostrado mediante las pruebas experimentales reveladas en los Ejemplos 8 y 9 de la descripción que el empleo de procesos de conjugación específicos para cada conjugado dentro de una mezcla de conjugados de N. Meningitidis permite lograr de manera sorprendente una respuesta inmune con mayor balance entre los conjugados meningocócicos individuales.

(g) Finalmente, considero de gran importancia resaltar que las nuevas reivindicaciones 10 y 11 (correspondientes a las reivindicaciones 15 y 16 actualmente presentadas) se caracterizan porque se encuentran dirigidas a proteger un kit de vacuna que comprende la composición de vacuna revelada en las nuevas reivindicaciones 1 a 8, así como un proceso para la elaboración de dicha vacuna de

conformidad con las reivindicaciones 1 a 8, y por lo tanto resultan ser inventivas frente a las enseñanzas de los documentos D2 y D3 debido a que el documento D3 tampoco enseña o sugiere que el empleo de procesos de conjugación específicos para cada conjugado dentro de una mezcla de conjugados de *N. Meningitidis* permite lograr una respuesta inmune con mayor balance entre los conjugados meningocócicos individuales, así como tampoco enseña o sugiere una vacuna de combinación que emplee la misma proteína portadora para cada conjugado, pero en donde la supresión inmune del portador sea reducida gracias al empleo de una química de conjugación distinta para los diferentes conjugados que hacen parte de la vacuna de combinación.

Visto lo anterior, atentamente me permito manifestar que **el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente en cuestión presenta un inequívoco carácter inventivo frente a la combinación de las enseñanzas de los documentos D1, D2 y D3**, cumpliendo por lo tanto a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000.

2.3. Consideraciones técnicas específicas frente a la combinación de los documentos D1 y D2 como supuesto mecanismo para llegar a las características de las composiciones inmunogénicas reveladas en la presente invención

En la Resolución Número **61144** se afirma que la combinación de las enseñanzas de los documentos D1 y D2 le permite a la persona medianamente versada en la materia reunir todas las características técnicas de las composiciones inmunogénicas reveladas en la solicitud de patente en cuestión, sin que lo anterior implique un esfuerzo inventivo. En este sentido, en dicha Resolución se afirma específicamente lo siguiente:

*"...el documento D2 revela que los sacáridos capsulares de *N. meningitidis* se pueden conjugar con proteínas portadoras como la CRM197 o TT, entre otras (pág. 4, líneas 15-21) para mejorar su inmunogenicidad en vacunas pediátricas, y establece que los sacáridos pueden ser activados antes de la conjugación y que la activación comprende por ejemplo agentes cianilantes como CDAP // En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría ésta característica del documento D2, el cual enseña que los sacáridos pueden estar conjugados a la proteína portadora directamente o a través de un enlazante, a las composiciones del documento D1 para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera que no presenta nivel inventivo".*

Con respecto a lo anterior, atentamente me permito presentar ante ese Despacho las siguientes consideraciones técnicas:

- De acuerdo con lo afirmado por ese Despacho, todas las características de las composiciones inmunogénicas reveladas en la reivindicación 1 de la solicitud de patente en cuestión son enseñadas por el arte previo, específicamente por los documentos D1 y D2, desconociendo por lo tanto que en ninguna de dichas anterioridades se enseña o se sugiere emplear distintos métodos de conjugación dentro de una misma composición. De manera específica me permito señalar que en la Resolución impugnada se establece repetidamente que en el documento D1 se enseña que los conjugados MenA, MenC, MenW y MenY pueden ser combinados en una composición tetravalente y que dicha anterioridad sugiere la existencia de diferentes métodos de conjugación. Sin embargo, a partir del atento análisis de los ejemplos 3 y 5 divulgados en D1 es claro que allí se utiliza exactamente el mismo proceso de conjugación para los cuatro conjugados (el polisacárido es derivatizado con un enlazante ADH y posteriormente unido a la proteína portadora empleando EDAC), más de ninguna manera se sugiere el concepto de combinar diferentes métodos de conjugación para conjugados diferentes dentro de una misma composición.
- Otra de las características de las composiciones inmunogénicas de la reivindicación 1 que no es mencionada en el documento D1 es la selección de los conjugados que deben conjugarse mediante un enlazante y de los conjugados que deben conjugarse directamente, toda vez que D1 no ofrece ninguna enseñanza o sugerencia tendiente a explicar por qué deben emplearse métodos de conjugación diferentes, cuáles polisacáridos deben conjugarse directamente y cuáles deben conjugarse mediante un enlazante.
- Ahora bien, a partir de la atenta lectura del documento D2 es claro que dicha anterioridad no enseña las características técnicas de las composiciones inmunogénicas de la reivindicación 1 que no son enseñadas en D1, toda vez que D2 se encuentra también dirigido a describir vacunas de conjugados meningocócicos multivalentes en las cuales se emplean exactamente los mismos procesos de conjugación para todos los serogrupos (*en efecto, en las páginas 15 a 18 de D2 se describe que la conjugación de MenA, Men W y MenY se lleva a cabo para todos los casos de la siguiente manera: el polisacárido es hidrolizado, un grupo amino primario es adicionado al sacárido y es derivatizado hasta un éster activo*

empleando diéster N-hidroxisuccinimido del ácido adípico, y finalmente el sacárido derivatizado es conjugado a la proteína portadora pero mezclando el éster y la proteína).

- Pese a lo anterior, esto es, a pesar de que D2 enseña que la conjugación de todos los serotipos debe llevarse a cabo a través de un enlazante, en la resolución impugnada se afirma que en la página 5 (líneas 4 a 7) de dicha anterioridad se sugiere que la conjugación directa puede reemplazar la conjugación a través de un enlazante:

"Como una alternativa al empleo de un enlazante, puede emplearse el enlazamiento directo. Enlaces directos a la proteína pueden comprender la oxidación de los polisacáridos seguido por la aminación reductiva de la proteína, tal y como se describe en, por ejemplo, las referencias 54 y 55" (Traducción simple al castellano de la página 5 -líneas 4 a 7- de D2).

Sin embargo, es claro que el párrafo anterior tampoco ofrece alguna enseñanza o sugerencia tendiente a explicar por qué deben mezclarse dentro de una misma composición métodos de conjugación diferentes, y mucho menos ofrece alguna enseñanza o sugerencia con respecto a cuáles polisacáridos deben conjugarse directamente y cuáles deben conjugarse mediante un enlazante.

- De acuerdo con lo anterior, es absolutamente claro que el estado de la técnica le enseña a la persona medianamente versada en la materia que todos los conjugados deben obtenerse empleando el mismo proceso de conjugación (ya sea directamente o mediante un enlazante), enseñanza que se basa en razones válidas teniendo en cuenta que llevar a cabo un proceso de conjugación uniforme para todos los serotipos da lugar a una simplificación del proceso de obtención de una vacuna de conjugados multivalente, toda vez que pueden emplearse reacciones de conjugación similares para múltiples conjugados y se cuenta con una amplia flexibilidad para cambiar las condiciones de conjugación.

Por lo tanto, es claro que para la persona medianamente versada en la materia no sería evidente modificar el proceso de conjugación enseñado en el arte previo por un proceso más complejo que involucra la combinación de conjugación directa y conjugación a través de un enlazante como parte de una misma composición.

- Contrario a lo anterior, el solicitante de la invención en cuestión ha demostrado que adaptar el método de conjugación dependiendo de los serogrupos a ser conjugados permite de manera sorprendente mejorar la inmunogenicidad de toda la composición y el desarrollo de una respuesta inmune balanceada en contra de todos los componentes de dicha composición, tal y como se analiza en detalle a continuación con base en los resultados de los ejemplos 8 y 9 de la descripción.

2.4. Análisis específico de los resultados de inmunogenicidad revelados en los ejemplos 8 y 9 de la descripción

De otro lado, en la Resolución Número **61144** se afirma que los ejemplos 8 y 9 revelados en la solicitud de patente en cuestión no demuestran algún efecto inesperado de las composiciones reclamadas, y que se encuentran incongruencias entre los resultados mostrados en dichos ejemplos. En este sentido, en dicha Resolución se afirma específicamente lo siguiente:

"Al respecto, es importante establecer que los ejemplos 8 y 9 no demuestran algún efecto inesperado de las composiciones reclamadas. En primer lugar, las anterioridades D1 y D2 revelan composiciones donde los sacáridos de los serogrupos MenA y MenC también se encuentran conjugados con una proteína portadora a través de un enlazante, y los ejemplos presentados no contienen ninguna formulación en la que todos los serogrupos (incluyendo MenW y MenY) se encuentren conjugados a través de un enlazante, de tal manera que sea posible establecer el efecto superior de conjuguar directamente los sacáridos de menW y MenY sobre conjugarlos por medio de un enlazante. En segundo lugar, la reivindicación 1 reclama composiciones en las que MenC no se encuentra conjugado con la proteína portadora a través de un enlazante y es claro en el ejemplo 8 que el porcentaje de respuesta para MenC cuando está conjugado directamente es más bajo que para los demás serogrupos cuando las concentraciones de conjugado son las mismas. Adicionalmente, respecto a la respuesta balanceada argumentada por la solicitante, no es claro a qué se refiere con dicha afirmación, ya que en el ejemplo 8 se observa que el porcentaje de respuesta para MenC es más bajo que para los conjugados de los demás serogrupos, en el ejemplo 9 se observa que el porcentaje de respuesta de MenA disminuye, al igual que para MenY (ver ejemplo 8 formulación F1 y ejemplo 9 formulación F3) y los títulos de anticuerpo tampoco son similares para todos los serogrupos".

Con respecto a lo anterior, atentamente me permito presentar ante ese Despacho las siguientes consideraciones técnicas:

- La afirmación realizada en la Resolución impugnada de acuerdo con la cual no existe un efecto sorprendente derivado de emplear una mezcla de conjugación directa e indirecta, es absolutamente contraria a los resultados experimentales mencionados en los ejemplos 8 y 9 de la presente invención, por medio de los cuales composiciones que comprenden diferentes conjugados y procesos de conjugación mezclados se compararon con conjugados obtenidos mediante conjugación directa, lo anterior debido a que los inventores de la solicitud de patente en cuestión se dieron cuenta que los conjugados Men A y Men C tienden a mostrar resultados de inmunogenicidad menores que aquellos obtenidos con MenW135 y Men Y, razón por la cual cuando los cuatro conjugados eran combinados en una vacuna tetravalente se obtenían niveles de inmunogenicidad particularmente bajos. Sin embargo, tal y como se demuestra mediante los resultados divulgados en los ejemplos 8 y 9 de la descripción, dicho problema fue resuelto al emplear procesos de conjugación mezclados (utilizando un enlazante para conjugar Men A en el ejemplo 8 y Men A y Men C en el ejemplo 9), toda vez que de esa forma se logró obtener buena inmunogenicidad contra todos los serogrupos Men A, Men C, MenW y Men Y combinados en una vacuna tetravalente.
- De manera específica me permito señalar que en el ejemplo 8 de la descripción se muestran los resultados de conjugar Men A por medio de un enlazante como parte de una prueba clínica, y de acuerdo con tales resultados la adición de un enlazante AH en la muestra F1 (página 93, Tabla 12) tiene un efecto favorable sobre Men A cuando éste hace parte de una vacuna que comprende los conjugados Men y, W, C y A, toda vez que el porcentaje de respondientes a SBA Men A aumenta de 66,7% a 90,9% como resultado de la introducción de dicho enlazante. Adicionalmente, lo anterior también se ve reflejado en mayores SBA GTM (4335 aumenta a 9805) y mayores lecturas de ELISA GMC (5,46 aumenta a 20,38), hecho que resulta ser independiente de las respuestas logradas contra Men Y, W y C debido a que los resultados con las muestras F1 y F4 divulgados en la Tabla 12 demuestran que tales conjugados no se vieron afectados adversamente por el cambio realizado en el conjugado Men A.

- Por su parte, en el ejemplo 9 se investigó el efecto de conjugar Men A y Men C a través de un enlazante y conjugar Men W y Men Y mediante conjugación directa, encontrándose que la respuesta frente a Men A (muestra F3) se mantuvo similar a aquella lograda en la muestra F1 y detallada en el ejemplo 8, la respuesta inmune contra Men C fue mejorada al haber adicionado un enlazante a dicho conjugado (el porcentaje de respondientes aumentó de 69,6% hasta 95,8%), mientras que se mantuvieron excelentes respuestas inmunes contra los antígenos Men W y Men Y.
- Una vez aclarado lo anterior, atentamente me permito manifestar de manera categórica ante ese Despacho que los resultados experimentales divulgados en los ejemplos 8 y 9 de la solicitud de patente en cuestión son mejores que aquellos divulgados en el documento D2 porque en dicha anterioridad únicamente se mencionan valores experimentales obtenidos con ratones, mientras que en la presente invención se revelan resultados de pruebas clínicas que reflejan la respuesta inmune lograda cuando las composiciones a proteger son empleadas para inmunización humana. Ahora bien, con respecto al documento D1 resulta de gran importancia mencionar que si bien existen diferencias en cuanto a dosis, edad de los pacientes y proteínas portadoras entre las pruebas mencionadas en dicha anterioridad y aquellas reveladas en los ejemplos 8 y 9 de la presente invención, es claro que los procesos de conjugación llevados a cabo en D1 son similares a aquellos empleados en la muestra F4 mencionada en el ejemplo 8 de la solicitud de patente en cuestión, razón por la cual es posible comparar los resultados obtenidos por los autores del documento D1 y aquellos obtenidos en la presente invención al realizar un análisis comparativo entre los resultados de las muestras F4 (correspondiente a D1) y F1 del ejemplo 8 de la descripción.

Ahora, al llevar a cabo dicho análisis comparativo es claro que los resultados de inmunogenicidad para la muestra F1 del ejemplo 8 muestran un importante incremento en cuanto a SBA GTM para Men A (4305 a 9805) cuando dicho conjugado es enlazado con AH, al tiempo que MenC GMY incrementa de 2391 hasta 3989, MenW GTM incrementa desde 4621 hasta 5418 y MenY GTM incrementa desde 6742 hasta 7122, mientras que en la muestra F4 del ejemplo 8 no se observa incremento alguno en cuanto a SBA GTM para Men A.

- Adicionalmente y dejando de lado el hecho de que existen diferencias en cuanto a dosis, edad de los pacientes y proteínas portadoras entre las pruebas mencionadas en el documento D1 y aquellas reveladas en los ejemplos 8 y 9 de la presente invención, si se comparan los resultados divulgados en dicha anterioridad (específicamente los mencionados en la Tabla C-11 de la página 97 de D1 donde las pruebas clínicas se llevaron a cabo con pacientes adolescentes) con aquellos divulgados en la solicitud de patente en cuestión, se tiene que las composiciones reveladas en la presente invención permiten obtener mejores resultados de inmunogenicidad, tal y como se muestra a continuación:

Serogrupo	IgG GMC TetramenD	IgG GMC Ejemplo 8	SBA GMT TetraMenD	SBA GMT Ejemplo 8
MenA	18,09	20,38	5483,21	9805
MenC	5,54	12,11	1924,36	3989
MenY	4,41	16,3	1322,26	7122
MenW	2,95	9,65	1407,22	5418

Los valores para TetramenD fueron extraídos de la página 97 del documento D1

De lo anterior es claro que, contrario a lo afirmado por ese Despacho en la Resolución Número **61144**, los resultados experimentales divulgados en los ejemplos 8 y 9 de la solicitud de patente en cuestión demuestran de manera contundente que las composiciones inmunogénicas reveladas presentan un efecto técnico sorprendente frente a las enseñanzas del estado de la técnica anterior, toda vez que la persona medianamente versada en la materia técnica en cuestión de ninguna manera encuentra en los documentos D1 y D2 enseñanzas o datos experimentales que le permitan sugerir de manera evidente que la conjugación de MenA y MenC mediante un enlazante como parte de una vacuna tetravalente conteniendo adicionalmente MenW y MenY conjugados directamente, permite obtener una buena inmunogenicidad en contra de todos los serogrupos.

3) RESPUESTA A LOS ARGUMENTOS PRESENTADOS EN LA RESOLUCIÓN IMPUGNADA

De conformidad con los anteriores argumentos, me permito señalar ante ese Despacho que las afirmaciones presentadas en la Resolución impugnada carecen de toda relevancia para desvirtuar el nivel inventivo de la presente solicitud, tal como me permito señalar a continuación:

- En la Resolución Número **61144** de la SIC se afirma que: *"...la solicitante presenta dos solicitudes diferentes en las cuales reclama las mismas composiciones. En la solicitud 07-136726 la solicitante establece que la ventaja de dichas composiciones se debe a que la cantidad de proteína portadora en los conjugados de los serogrupos A y C es mayor que la cantidad de proteína portadora en los conjugados de los serogrupos C, W y Y, y en la presente solicitud establece que la ventaja se debe al uso de un enlazante dentro de los conjugados de MenA y MenC y la conjugación directa para los conjugados de menC, MenW y MenY. Sin embargo, a pesar de ser reivindicadas de forma diferente, las composiciones de las dos solicitudes (al igual que los ejemplos presentados) son las mismas, producidas por los mismos métodos y, por tanto, no puede la solicitante pretender protección para la misma composición a través de dos solicitudes diferentes".*

En respuesta a lo anterior me permito aclarar que si bien la materia técnica revelada en la presente invención y en la solicitud de patente colombiana CO 07-136.726 se basan en los resultados de las mismas pruebas clínicas llevadas a cabo por el solicitante, las solicitudes se encuentran dirigidas a proteger invenciones que están basadas en conceptos inventivos diferentes, razón por la cual si hubieran sido reveladas en un único documento de patente habrían sido objetadas por falta de unidad de invención.

En consecuencia, atentamente solicito a ese Despacho la reconsideración de las objeciones realizadas a éste respecto.

CONCLUSIONES

Con base en los argumentos técnicos mostrados previamente, me permito manifestar ante ese Despacho que la materia revelada en la solicitud de patente en cuestión presenta un inequívoco carácter inventivo frente a las enseñanzas de los documentos citados en la Resolución Número **61144** aquí impugnada, cumpliendo de esta manera con las disposiciones establecidas en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000, y por lo tanto demostrando ser merecedora del privilegio de patente revocado.

En efecto, a lo largo del presente escrito se ha demostrado que si bien los documentos D1 y D2 divulgan composiciones inmunogénicas que comprenden combinaciones de MenA, MenC, MenW y/o MenY, los cuales son conjugados mediante un enlazante a una proteína portadora, ninguna de tales anterioridades divulga una combinación de conjugados en donde algunos son conjugados mediante un enlazante

a la proteína portadora y otros son conjugados directamente a la proteína portador, y de hecho, a partir de la atenta lectura de los documentos D1 y D2 es claro que ninguna de tales anterioridades enseña o sugiere qué conjugados deben ser conjugados a través de qué método en particular con el objetivo de lograr que una vacuna tetravalente conteniendo MenA, MenC, MenW y MenY se caracterice por mostrar una buena inmunogenicidad en contra de todos los serogrupos.

En consecuencia y en aras de restablecer los derechos vulnerados al solicitante, tal y como fue explicado a lo largo del presente escrito, atentamente solicito a ese Despacho considerar los argumentos expuestos anteriormente y revocar en su totalidad la Resolución Número **61144**.

II. PETICIÓN

En vista de todo lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y argumentaciones presentadas y proceder a revocar la Resolución Número 61144, con el fin de que se conceda el privilegio de patente a la presente invención.

III. PODER

Finalmente me permito recordarle a este Despacho que el documento que acredita mi calidad de representante legal en Bogotá para asuntos relativos a la Propiedad Industrial de la sociedad peticionaria, fue presentado ante dicha entidad junto con mi solicitud de fecha 27 de diciembre de 2008.

IV. ANEXOS

Anexo al presente recurso me permito presentar:

i) Solicitud original: "VACUNA DE CONJUGADOS DE SACÁRIDOS DE NEISSERIA MENINGITIDIS" con sus respectivos anexos; y

ii) Solicitud Divisional A: "VACUNA DE CONJUGADOS DE SACÁRIDOS DE NEISSERIA MENINGITIDIS" con sus respectivos anexos tal como fue mencionado en el literal (b) del punto 1.

JOSE LLORED CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

V. DOMICILIO

Mi dirección es Calle 72 No. 5-83, Piso 6º, Bogotá D.C.

Del Señor Superintendente,



ALICIA LLORED RICAURTE

T.P. 53.215

Dirección para Notificaciones: notificacionespatentes@lloedacamacho.com

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0097817

Bogotá D.C., Septiembre 25 de 2012 - 08:10:30

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455230705	24/09/2012	4.725.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				\$30.000.00
			=====	

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 25 de 2012 - 08:10:35

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica, la cual comprende dos, tres o cuatro sacáridos capsulares de *N. meningitidis* diferentes, en
5 donde uno o más se seleccionan a partir de un primer grupo que consiste en MenA y MenC, los cuales se conjugan a través de un enlazante bifuncional con una proteína portadora, y uno o más sacáridos diferentes se seleccionan a partir de un segundo grupo que consiste en MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan
10 directamente con proteína(s) portadora(s), donde cada sacárido capsular de *N. Meningitidis* está conjugado a toxoide de tétanos (TT) y donde cada sacárido capsular de *N. meningitidis* está conjugado separadamente a una proteína portadora separada.

2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, la
15 cual comprende el sacárido capsular MenA conjugado a través de un enlazante con una proteína portadora de toxoide de tétanos, y el sacárido capsular MenC directamente conjugado con una proteína portadora de toxoide de tétanos.

3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, la
20 cual comprende el sacárido capsular MenC conjugado a través de un enlazante con una proteína portadora de toxoide de tétanos, y el sacárido capsular MenY conjugado directamente con una proteína portadora de toxoide de tétanos.

4. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, la cual comprende los sacáridos capsulares MenA y MenC conjugados a través de un enlazante con proteína(s) portadora(s) de toxoide de tétanos, y los sacáridos capsulares MenY y MenW conjugados directamente con proteína(s) portadora(s) de toxoide de tétanos.

5. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, la cual comprende el sacárido capsular MenA conjugado a través de un enlazante con una proteína portadora de toxoide de tétanos, y los sacáridos capsulares MenC, MenY, y MenW conjugados directamente con proteína(s) portadora(s) de toxoide de tétanos.

6. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 a 5, en donde uno, dos, o tres conjugados de sacárido de *N. meningitidis* se conjugan directamente mediante la química de 1-ciano-4-dimetilaminopiridina tetrafluoroborato (CDAP).

7. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde uno, dos, o tres sacáridos capsulares de *N. meningitidis*, se conjugan con la proteína portadora de toxoide de tétanos por medio de un enlazante bifuncional.

8. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual comprende además un sacárido capsular de *H. influenzae* b (Hib) conjugado con una proteína portadora de toxoide de tétanos, donde la razón de Hib a proteína portadora en el conjugado sacárido capsular de Hib es entre 1:5 y 5:1 (p/p).

9. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. Un kit de vacuna para su administración concomitante o en secuencia, el cual comprende dos composiciones inmunogénicas multivalentes para conferir protección en un hospedero contra una enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Haemophilus influenzae*, y *Neisseria meningitidis*, comprendiendo este kit un primer recipiente que comprende:

toxoides de tétanos (TT),

toxoides de difteria (DT), y

componentes de tosferina de células enteras o acelulares,

y un segundo recipiente que comprende:

15 la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

11. Un proceso para la elaboración de la vacuna de la reivindicación 10, el cual comprende el paso de mezclar la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

DIVISIONAL
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS,
S.A.

EXPEDIENTE NO. 07-136.747A



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 07-136.747A

54. TITULO "VACUNA DE CONJUGADOS DE SACÁRIDOS DE
NEISSERIA MENINGITIDIS"

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K 39/095

71. SOLICITANTE GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, S.A.

DOMICILIO RIXENSART, BÉLGICA.

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

22. BOGOTA, D.C. _____

(FORMA P 10)

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1.

Identificación del Trámite

☐ Conversión

☐ División

☐ Fusión

☐ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2.

Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☐

ABBVIE, INC.

Nombre o denominación // Nombre o razón social

ALICIA LLOREDA RICAURTE

Nombre del representante legal

Tipo de empresa

☐ Micro

☐ Pequeña

☐ Mediana

☐ Otra

39.690.713 de Usaquén

Documento de identificación:

C.C.

C.E.

NIT

Otro

Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Bélgica	Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart,	Rixensart

Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
notificacionespatentes@lloredacamacho.com	6069701	3264270

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3.

Datos del apoderado:

ALICIA LLOREDA RICAURTE

39.690.713 de Usaquén

53.215

Apellidos y Nombre

documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio		Ciudad
Calle 72 No 5-83 piso 5to		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
notificacionespatentes@lloredacamacho.com	6069701	3264270

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sirvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del trámite

CONVERSION

Expediente

De:
A:

DIVISION

Expediente

07-136.747
De: 07-136.747
A: 07-136.747A

FUSION

Expediente

De:
A:

5. Comprobante de Pago No 12-108169

Fecha 13/11/12

6. Anexos

☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación

☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación

☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división

☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud

☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

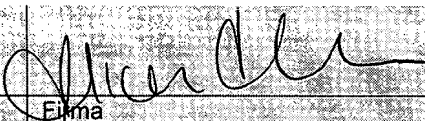
7. Firma

ALICIA LLOREDA RICAURTE

Nombre y apellidos

39.690.713 de Usaquén

C.C



Firma

53.215

Tarjeta Profesional

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 108169	
				Bogotá D.C., Octubre 16 de 2012 - 17:06:56	
RECIBIDO DE : LLORED A & CIA. S.A.				NI 830.022.145	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	452484616	16/10/2012	12.820.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1 50005-01-01	SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00	
				\$590.000.00	
=====					
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 07-136747- -00009-0000 Fecha: 2012-11-29 17:14:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 139					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Octubre 16 de 2012 - 17:07:02					

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 117227
		Bogotá D.C., Noviembre 13 de 2012 - 17:00:25

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	485402622	13/11/2012	8.130.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
10	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	300.000.00
				<u>\$300.000.00</u>
			=====	

SON: ****TRESCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE****

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-136747- -00009-0000
Fecha: 2012-11-29 17:14:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 139

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 109968	
				Bogotá D.C., Octubre 22 de 2012 - 16:18:24	
RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.				NI 830.022.145	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	450456661	22/10/2012	17.440.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
3 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	90.000.00	
				\$90.000.00	
=====					
SON: **NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 07-136747- -00009-0000 Fecha: 2012-11-29 17:14:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 139					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Octubre 22 de 2012 - 16:19:28					

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 109969	
				Bogotá D.C., Octubre 22 de 2012 - 16:18:24	
RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.				NI 830.022.145	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	450456661	22/10/2012	17.440.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
3 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	90.000.00	
				\$90.000.00	
=====					
SON: **NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 07-136747- -00009-0000 Fecha: 2012-11-29 17:14:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 139					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
. Octubre 22 de 2012 - 16:19:28					

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

PODER

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

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

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

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

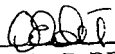
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

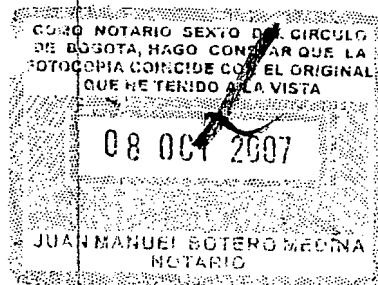
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

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

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



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

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
08 OCT 2007
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

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

CERTIFICO:

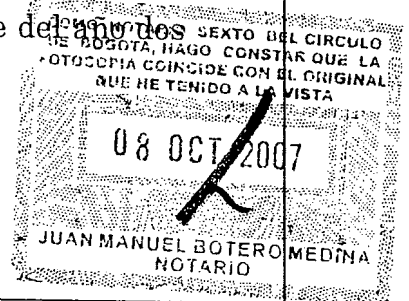
QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada "GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A." (anteriormente denominada "Smithkline Beecham Biologicals s.a."), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

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

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

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

Handwritten signature of James Kerr Milligan



JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



SCRIPER
NOTES

25
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**

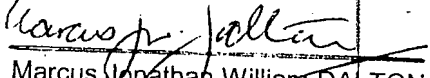
hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial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

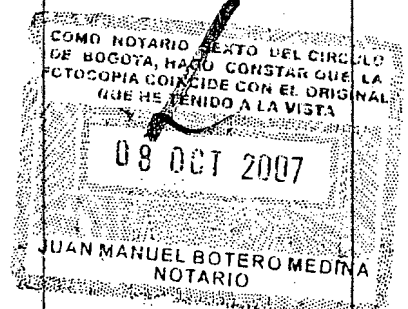
We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica {ss

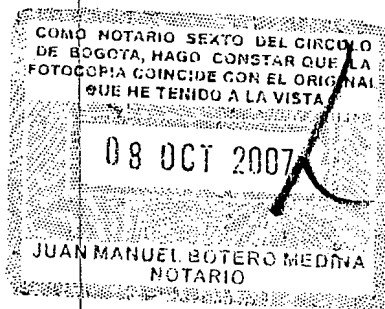
Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de **Bélgica**, domiciliada en la ciudad de **Rixensart, Bélgica**, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento es 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 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 07-136.747A		(51) Int Cl: A61K 39/095	
22) Fecha de solicitud: 27-12-07		(71) Solicitante(s) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(30) Prioridad (31) No. Prioridad 32) Fecha (33) País		(72) Inventor(es) BIEMANS, Ralph, Leon; BOUTRIAU, Dominique; CAPIAU, Carine; DENOEL, Philippe; DUVIVIER, Pierre v POOLMAN, Jan.	
0513069.5 0513071.1 27-06-05 GB		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
0515556.9 28-07-05 GB			
0524204.5 28-11-05 GB			
0526040.1 0526041.9 21-12-05 GB			
(85) Fecha limite 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: WO2007/000342 A3	
No. de solicitud PCT/EP2006/006269			
(54) Titulo: VACUNA DE CONJUGADOS DE SACÁRIDOS DE NEISSERIA MENINGITIDIS			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Una composición inmunogénica, la cual comprende cuando menos dos sacáridos capsulares de N. meningitidis diferentes, en donde uno o más se seleccionan a partir de un primer grupo que consiste en MenA, MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan a través de un enlazante con una proteína portadora, y uno o más sacáridos diferentes se seleccionan a partir de un segundo grupo que consiste en MenA, MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan directamente con proteína(s) portadora(s).



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Industria y Comercio

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud: 07-136.747A (22) Fecha de solicitud: 27-12-07

(51) Clasificación Internacional : A61K 39/095

(71) Solicitante(s) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

(72) Inventor(es) BIEMANS, Ralph, Leon; BOUTRIAU, Dominique; CAPIAU, Carine; DENOEL, Philippe; DUVIVIER, Pierre y POOLMAN, Jan.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
0513069.5	0513071.1	27.06.05	GB
	0515556.9	28.07.05	GB
	0524204.5	28.11.05	GB
0526040.1	0526041.9	21.12.05	GB

(85) Fecha limite 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: WO2007/000342 A3

No. de solicitud PCT/EP2006/006269

(54) Título: VACUNA DE CONJUGADOS DE SACÁRIDOS DE NEISSERIA MENINGITIDIS



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMATICO

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud: 07-136.747A		(22) Fecha de solicitud: 27-12-07	
(51) Clasificación Internacional : A61K 39/095			
(71) Solicitante(s) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			
(72) Inventor(es) BIEMANS, Ralph, Leon; BOUTRIAU, Dominique; CAPIAU, Carine; DENOEL, Philippe; DUVIVIER, Pierre y POOLMAN, Jan.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
0513069.5	0513071.1	27.06.05	GB
	0515556.9	28.07.05	GB
	0524204.5	28.11.05	GB
0526040.1	0526041.9	21.12.05	GB
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27-01-08		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 04-01-2007	
Fecha de presentación de la solicitud: 23-06-06		No.Publicación: WO 2007/000342.A3	
No. de solicitud PCT/EP2006/006269			

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Título: VACUNA DE CONJUGADOS DE SACÁRIDOS DE NEISSERIA MENINGITIDIS

(57) Resumen:
Reivindicación número 1.-
Una composición inmunogénica, la cual comprende cuando menos dos sacáridos capsulares de N. meningitidis diferentes, en donde uno o más se seleccionan a partir de un primer grupo que consiste en MenA, MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan a través de un enlazante con una proteína portadora, y uno o más sacáridos diferentes se seleccionan a partir de un segundo grupo que consiste en MenA, MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan directamente con proteína(s) portadora(s).

VACUNA DE CONJUGADOS DE SACÁRIDOS DE NEISSERIA
MENINGITIDIS

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La presente solicitud da a conocer una composición
inmunogénica, la cual comprende cuando menos dos sacáridos
capsulares de *N. meningitidis* diferentes, en donde uno o más se
seleccionan a partir de un primer grupo que consiste en MenA,
10 MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan a través de un
enlazante con proteína(s) portadora(s), y uno o más sacáridos
diferentes se seleccionan a partir de un segundo grupo que consiste
en MenA, MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan
directamente con una proteína(s) portadora(s).

15

* * * * *

20

25

VACUNA DE CONJUGADOS DE SACÁRIDOS DE NEISSERIA

MENINGITIDIS

La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden sacáridos capsulares bacterianos conjugados con una proteína portadora, en particular los sacáridos de *N. meningitidis*. Adicionalmente se refiere a vacunas y a kits de vacunas que comprenden estos conjugados de sacáridos, a procesos para elaborar las composiciones inmunogénicas y las vacunas, y al uso de las vacunas y de las composiciones inmunogénicas de la invención en terapia. También se refiere a métodos para inmunizar contra la infección utilizando los conjugados de sacáridos, y al uso de los conjugados de sacáridos en la fabricación de un medicamento.

Neisseria meningitidis es un patógeno humano gram-negativo que provoca meningitis bacteriana. Basándose en el polisacárido bacterial del organismo, se han identificado doce serogrupos de *Neisseria meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y, y Z). El serogrupo A (MenA) es la causa más común de la enfermedad epidémica en el África del sub-Sahara. Los serogrupos B y C son responsables de la mayoría de los casos en los países en desarrollo, siendo los casos restantes causados por W135 e Y.

En la técnica se conocen composiciones inmunogénicas que comprenden sacáridos de *N. meningitidis* conjugados con proteínas portadoras; teniendo la proteína portadora el efecto conocido de convertir el antígeno de polisacárido independiente de T en un antígeno dependiente de T capaz de desencadenar una respuesta de

memoria inmune. Por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 02/58737 da a conocer una vacuna que comprende polisacáridos capsulares purificados a partir de *N. meningitidis*, serogrupos A, C, W135, e Y, conjugados con una proteína portadora. Sin embargo, esta solicitud enseña que todos los polisacáridos deben conjugarse esencialmente de la misma manera (a través del mismo enlazante con la misma proteína portadora).

Sigue existiendo una necesidad de desarrollar mejores vacunas conjugadas contra meningitis por *Neisserial*. La presente invención se refiere a la provisión de una vacuna conjugada de polisacárido meningocócico, en donde la conjugación de cada polisacárido se hace a la medida (en lugar de ser uniforme), para lograr una vacuna de conjugación eficaz. En particular, es conveniente utilizar moléculas enlazantes para conjugar ciertos sacáridos meningocócicos con sus proteínas portadoras en combinación con otros que se conjugan directamente. De esta manera, los polisacáridos que sean inmunógenos menos buenos se pueden presentar ante el sistema inmune mediante un enlazante, y los que sean inmunógenos muy buenos se pueden conjugar directamente, de tal manera que no dominen la respuesta inmune a la combinación.

De conformidad con lo anterior, en un aspecto de la presente invención, proporciona una composición inmunogénica, la cual comprende cuando menos dos sacáridos capsulares de *N. meningitidis* diferentes, en donde uno o más se seleccionan a partir de un primer grupo que consiste en MenA, MenC, MenY, y MenW, los

cuales se conjugan a través de un enlazante con una proteína portadora, y uno o más sacáridos diferentes se seleccionan a partir de un segundo grupo que consiste en MenA, MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan directamente con una proteína portadora.

5 En la vacuna de MenAC, por ejemplo, MenA se puede conjuguar a través de un enlazante y MenC directamente. En la vacuna de MenCY, MenC se puede conjuguar a través de un enlazante, y MenY directamente. En una vacuna de MenACWY, MenA se puede conjuguar a través de un enlazante, y MenCWY directamente, o MenAC se
10 puede conjuguar a través de un enlazante y MenWY directamente.

 Una consideración adicional en una vacuna de combinación que comprende diferentes sacáridos conjugados con la misma portadora, es la cuestión de la supresión inmune de la portadora: se puede utilizar demasiada portadora, y se puede obstaculizar la respuesta
15 inmune. Con un planteamiento uniforme para la conjugación, la portadora presentará una mezcla similar de epítomos de células-B y de células-T ante el sistema inmune. Sin embargo, si la conjugación tiene lugar en diferentes grupos químicos dentro de la proteína portadora para un sacárido contra otro, las proteínas portadoras
20 probablemente serán diferentes hasta algún grado en la manera en que se presenten ante el sistema inmune.

 De conformidad con lo anterior, en una modalidad separada de la invención, se proporciona una composición inmunogénica que comprende cuando menos dos sacáridos diferentes conjugados por
25 separado con el mismo tipo de proteína portadora (por ejemplo,

toxioide de tétanos), en donde uno o más sacáridos se conjugan con la proteína portadora por medio de un primer tipo de grupo químico sobre la proteína portadora, y uno o más sacáridos se conjugan con la proteína portadora por medio de un segundo tipo (diferente) de grupo químico sobre la proteína portadora.

Los primero y segundo tipos de grupos químicos pueden estar presentes en la proteína portadora sobre un primer y segundo conjuntos de aminoácidos mutuamente exclusivos de la proteína portadora (por ejemplo, ciertos residuos de ácido aspártico/ácido glutámico en un conjunto, y ciertos residuos de lisina en el segundo). Un sacárido se puede conjugar con un grupo carboxilo sobre la portadora, y otro sobre un grupo amino, por ejemplo. Esta conjugación puede involucrar la conjugación sobre epítopos separados de células-B y/o células-T para cada conjugado diferente.

Por ejemplo, en una vacuna de MenAC, se puede enlazar MenA con un primer tipo de grupo químico (tal como carboxilo) sobre la proteína portadora, y se puede enlazar MenC con un segundo tipo (tal como amino). En una vacuna de MenCY, se puede enlazar MenC con un primer tipo de grupo químico (tal como carboxilo) sobre la proteína portadora, y se puede enlazar MenY con un segundo tipo (tal como amino). En una vacuna de MenACWY, se puede enlazar MenAC con un primer tipo de un grupo químico (tal como carboxilo) sobre la proteína portadora, y se puede enlazar MenWY con un segundo tipo (tal como amino), o se puede enlazar MenA con un primer tipo de grupo químico (tal como carboxilo) sobre la proteína

portadora, y se puede enlazar MenCWY con un segundo tipo (tal como amino).

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para inmunizar a un hospedero humano
5 contra una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis*, el cual comprende administrar al hospedero una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna de la invención.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición inmunogénica de la invención para
10 utilizarse en el tratamiento o en la prevención de una enfermedad causada por *Neisseria meningitidis*.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de la composición inmunogénica o vacuna de la invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o
15 la prevención de enfermedades causadas por *Neisseria meningitidis*.

Descripción de las Figuras

Figura 1-A - Diagrama de barras que muestra las respuestas de GMC en un ELISA anti-MenY. ENYTT012 es un conjugado de MenY-TT preparado a partir del polisacárido nativo MenY. ENYTT014 es un
20 conjugado de MenY-TT preparado a partir de un polisacárido de MenY microfluidizado, que se ha sometido a 40 ciclos de microfluidización. ENYTT015bis es un conjugado de MenY-TT preparado a partir del polisacárido MenY microfluidizado, que se ha sometido a 20 ciclos de microfluidización.

25 Figura 1-B - Diagrama de barras que muestra las respuestas de

GMT en un ensayo SBA anti-MenY. ENYTT012 es un conjugado de MenY-TT preparado a partir del polisacárido MenY nativo. ENYTT014 es un conjugado de MenY-TT preparado a partir del polisacárido MenY microfluidizado, que se ha sometido a 40 ciclos de microfluidización. ENYTT015bis es un conjugado de MenY-TT
5 preparado a partir de un polisacárido MenY microfluidizado, que se ha sometido a 20 ciclos de microfluidización.

Descripción Detallada

En un aspecto de la presente invención, se proporciona una
10 composición inmunogénica que comprende cuando menos dos
sacáridos capsulares de *N. meningitidis* diferentes, en donde uno o
más se seleccionan a partir de un primer grupo que consiste en
MenA, MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan a través de un
enlazante con una proteína portadora, y uno o más sacáridos
15 diferentes se seleccionan a partir de un segundo grupo que consiste
en MenA, MenC, MenY, y MenW, que se conjugan directamente con
una proteína portadora.

De una manera más específica, el primer grupo puede consistir
en MenA y MenC, y el segundo grupo consiste en MenC, MenY, y
20 MenW. Las modalidades particulares de la invención son
composiciones inmunogénicas que comprenden: un sacárido capsular
MenA conjugado a través de un enlazante con una proteína
portadora, y un sacárido capsular MenC directamente conjugado con
una proteína portadora; un sacárido capsular MenC conjugado a
25 través de un enlazante con una proteína portadora, y un sacárido

capsular MenY directamente conjugado con una proteína portadora; los sacáridos capsulares MenA y MenC conjugados a través de un enlazante con una proteína portadora, y los sacáridos capsulares MenY y MenW directamente conjugados con una proteína portadora; 5 el sacárido capsular MenA conjugado a través de un enlazante con una proteína portadora, y los sacáridos capsulares MenC, MenY y MenW directamente conjugados con una proteína portadora. En cualquiera de estas modalidades, también se puede incluir un conjugado de Hib, el cual se enlaza con una proteína portadora 10 (véase la lista de portadoras anteriormente y más adelante, por ejemplo TT) directamente o a través de un enlazante.

El término "sacárido", a través de toda esta memoria descriptiva, puede indicar polisacárido u oligosacárido, e incluye ambos. Los polisacáridos se aíslan a partir de bacterias, o se aíslan 15 a partir de bacterias y se dimensionan hasta algún grado mediante métodos conocidos (véase, por ejemplo, las Patentes Europeas Números EP497525), y opcionalmente mediante microfluidización. Los polisacáridos se pueden dimensionar con el objeto de reducir la viscosidad en las muestras de polisacáridos, y/o para mejorar la 20 posibilidad de filtración para los productos conjugados. Los oligosacáridos tienen un bajo número de unidades de repetición (típicamente de 5 a 30 unidades de repetición), y típicamente son polisacáridos hidrolizados.

Cada sacárido capsular de *N. meningitidis* (y/o Hib) se puede 25 conjuguar con una proteína portadora independientemente

seleccionada a partir del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, y proteína D. Más adelante se presenta una lista más completa de las proteínas portadoras que se pueden utilizar en los conjugados de la invención. Aunque uno o más sacáridos capsulares de *N. meningitidis* (y/o Hib) se pueden conjugar con diferentes proteínas portadoras unos de otros, en una modalidad, todos se conjugan con la misma proteína portadora. Por ejemplo, se pueden conjugar todos con la misma proteína portadora seleccionada a partir del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, y proteína D. En este contexto, se puede considerar que CRM197 y DT son la misma proteína portadora, debido a que difieren solamente por un aminoácido. En una modalidad, todos los sacáridos capsulares de *N. meningitidis* (y/o Hib) presentes se conjugan con TT.

Si la proteína portadora es la misma para dos o más sacáridos en la composición, el sacárido se podría conjugar con la misma molécula de la proteína portadora (moléculas portadoras que tienen dos sacáridos diferentes más conjugados con ellas) [véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 04/083251; por ejemplo, una sola proteína portadora se podría conjugar con MenA y MenC; MenA y MenW; MenA y MenY; MenC y MenW; MenC y MenY; MenW y MenY; MenA, MenC y MenW; MenA, MenC y MenY; MenA, MenW y MenY; MenC, MenW y MenY; MenA, MenC, MenW y MenY; Hib y MenA; Hib y MenC; Hib y MenW; o Hib y MenY]. De una manera alternativa, cada uno de los sacáridos se puede conjugar por

separado con diferentes moléculas de la proteína portadora (teniendo cada molécula de la proteína portadora solamente un tipo de sacárido conjugado con ella).

5 Las composiciones inmunogénicas del primer aspecto de la invención también pueden tener cualquiera o todas las características adicionales del segundo aspecto de la invención, y *viceversa*.

10 En un segundo aspecto de la invención, se presenta una composición inmunogénica que comprende cuando menos dos conjugados de sacáridos diferentes, conjugados por separado con el mismo tipo de proteína portadora, en donde uno o más sacáridos se conjugan con la proteína portadora por medio de un primer tipo de grupo químico sobre la proteína portadora, y uno o más sacáridos se conjugan con la proteína portadora por medio de un segundo tipo (diferente) de grupo químico sobre la proteína portadora.

20 En una modalidad, los dos conjugados involucran el mismo sacárido enlazado con la misma portadora, pero mediante diferentes químicas de conjugación. En una modalidad alternativa, se conjugan dos sacáridos diferentes con diferentes grupos sobre la proteína portadora.

25 “Se conjugan por separado con el mismo tipo de proteína portadora”, significa que los sacáridos se conjugan con la misma portadora individualmente (por ejemplo, MenA se conjuga con toxoide de tétanos a través de un grupo amina sobre el toxoide de tétanos, y MenC se conjuga con el toxoide de tétanos a través de un

grupo de ácido carboxílico sobre una molécula diferente de toxoide de tétanos).

Los sacáridos capsulares se pueden conjugar con la misma proteína portadora independientemente seleccionada a partir del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, y proteína D. Más adelante se presenta una lista más completa de las proteínas portadoras que se pueden utilizar en los conjugados de la invención. En este contexto, CRM197 y DT se pueden considerar como la misma proteína portadora, debido a que solamente difieren por un aminoácido. En una modalidad, todos los sacáridos capsulares presentes se conjugan con TT.

En una modalidad, el primero y segundo tipos de grupos químicos sobre la proteína portadora están presentes sobre epítopos separados de células-B y/o células-T sobre la proteína portadora. Es decir, están presentes sobre un conjunto diferente de epítopos de células-B y/o células-T unos de otros. Con el fin de predecir los epítopos de células-B para una portadora, se pueden emplear los métodos conocidos, tales como cualquiera o ambos de los siguientes dos métodos. Predicción de estructura bidimensional, y/o predicción de índice antigénico. La predicción de estructura bidimensional se puede hacer utilizando el programa PSIPRED (de David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, Reino Unido). El índice antigénico se puede calcular con base en el método descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]). Los parámetros utilizados en este

programa son el índice antigénico y la longitud mínima para un péptido antigénico. Se puede utilizar un índice antigénico de 0.9 para un mínimo de cinco aminoácidos consecutivos, como el umbral en el programa. Los epítomos de células auxiliares-T son péptidos

5 enlazados con moléculas de HLA clase II, y reconocidos por las células auxiliares-T. La predicción de los epítomos de células auxiliares-T útiles se puede basar en las técnicas conocidas, tales como el método TEPITOPE descrito por Stumliolo y colaboradores (Nature Biotech. 17:555-561 [1999]).

10 Los sacáridos se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en: sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis* (MenA), sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC); sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis* (MenY), sacárido capsular del serogrupo W de *N. meningitidis*

15 (MenW), sacárido capsular tipo b de *H. influenzae* (Hib), sacárido capsular del grupo I de *Streptococcus* grupo B, sacárido capsular del grupo II de *Streptococcus* grupo B, sacárido capsular del grupo III de *Streptococcus* Grupo B, sacárido capsular del grupo IV de *Streptococcus* grupo B, sacárido capsular del grupo V de

20 *Streptococcus* grupo B, sacárido capsular tipo 5 de *Staphylococcus aureus*, sacárido capsular tipo 8 de *Staphylococcus aureus*, sacárido Vi de *Salmonella typhi*, LPS de *N. meningitidis* (tal como L3 y/o L2), LPS de *M. catarrhalis*, LPS de *H. influenzae*, y de cualquiera de los sacáridos neumocócicos capsulares, tales como de los serotipos: 1,

25 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C,

19A, 19F, 20, 22F, 23F, ó 33F. En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención consiste en, o comprende, dos o más sacáridos diferentes del mismo género de bacteria (por ejemplo, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, o *Haemophilus*).

5 Los primero y segundo grupos presentes sobre la proteína portadora son diferentes uno del otro, e idealmente son grupos químicos naturales que se pueden utilizar fácilmente para propósitos de conjugación. Se pueden seleccionar independientemente a partir del grupo que consiste en: grupos carboxilo, grupos amino, grupos
10 sulfhidrilo, grupos hidroxilo, grupos imidazolilo, grupos guanidilo, y grupos indolilo. En una modalidad, el primer grupo químico es carboxilo, y el segundo es amino, o *viceversa*. Estos grupos se explican con mayor detalle más adelante.

En una modalidad específica, la composición inmunogénica
15 comprende cuando menos dos sacáridos capsulares de *N. meningitidis* diferentes, en donde uno o más se seleccionan a partir de un primer grupo que consiste en MenA y MenC, los cuales se conjugan con la proteína portadora por medio del primer tipo de grupo químico sobre la proteína portadora (por ejemplo, carboxilo), y
20 uno o más sacáridos diferentes se seleccionan a partir de un segundo grupo que consiste en MenC, MenY, y MenW, que se conjugan con la proteína portadora por medio del segundo tipo de grupo químico sobre la proteína portadora (por ejemplo, amino).

En una modalidad adicional, la composición inmunogénica de la
25 invención comprende MenA conjugado por medio del primer tipo de

grupo químico (por ejemplo, carboxilo), y MenC conjugado por medio del segundo tipo de grupo químico (por ejemplo, amino).

En otra modalidad, la composición inmunogénica comprende MenC conjugado por medio del primer tipo de grupo químico (por ejemplo, carboxilo), y MenY conjugado por medio del segundo tipo de grupo químico (por ejemplo, amino).

En otra modalidad, la composición inmunogénica comprende MenA conjugado por medio del primer tipo de grupo químico (por ejemplo, carboxilo), y MenC, MenY, y MenW conjugados por medio de un segundo tipo de grupo químico (por ejemplo, amino).

En otra modalidad, la composición inmunogénica comprende MenA y MenC conjugados por medio del primer tipo de grupo químico (por ejemplo, carboxilo), y MenY y MenW conjugados por medio del segundo tipo de grupo químico (por ejemplo, amino).

En cualquiera de las modalidades anteriores, también puede estar presente Hib, también conjugado con el mismo tipo de proteína portadora. Hib se puede conjugar con la portadora por medio del primero o del segundo tipo de grupo químico. En una modalidad, se conjuga por medio de un grupo carboxilo.

Consideraciones Generales en los Aspectos de la Invención.

Los sacáridos de la invención (en particular los sacáridos de *N. meningitidis* y/o el sacárido capsular de Hib), incluidos en las composiciones farmacéuticas (inmunogénicas) de la invención, se conjugan con una proteína portadora, tal como toxoide de tétanos (TT), fragmento C de toxoide de tétanos, mutantes no tóxicos de

toxina de tétanos [observe que se considera que todas estas
variantes de TT son el mismo tipo de proteína portadora para los
propósitos de esta invención], toxoide de difteria (DT), CRM197,
otros mutantes no tóxicos de toxina de difteria (tales como CRM176,
5 CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida y colaboradores, *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, Editor: Frankel, Maecel Dekker Inc.,
1992; supresión o mutación de Glu-148 a Asp, Gln, ó Ser, y/o Ala
10 158 a Gly, y otras mutaciones dadas a conocer en las Patentes de
los Estados Unidos de Norteamérica Números US4709017 ó US
4950740; mutación de cuando menos uno o más residuos Lys 516,
Lys 526, Phe 530, y/o Lys 534, y otras mutaciones dadas a conocer
en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US
15 5917017 ó US 6455673; o fragmentos dados a conocer en la Patente
de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5843711]
(observe que todas estas variantes de DT se consideran del mismo
tipo de proteína portadora para los propósitos de esta invención),
neumolisina neumocócica (Kuo y colaboradores (1995) *Infect.*
20 *Immun.* 63; 2706-13), OMPC (proteína de membrana externa
meningocócica - usualmente extraída de *N. meningitidis*, serogrupo B
- Patente Europea Número EP0372501), péptidos sintéticos
(Patentes Europeas Números EP0378881, EP0427347), proteínas de
choque por calor (Publicaciones Internacionales Números WO
25 93/17712, WO 94/03208), proteínas de tosferina (Publicación

Internacional Número WO98/58668, y Patente Europea Número EP0471177), citoquinas, linfocinas, factores de crecimiento u hormonas (Publicación Internacional Número WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de células-T
5 CD4+ humanas a partir de diferentes antígenos derivados de patógenos (Falugi y colaboradores (2001) *Eur. J. Immunol.* 31; 3816-3824), tales como proteína N19 (Baraldoi y colaboradores (2004), *Infect. Immun.* 72; 4884-7), proteína superficial neumocócica PspA (Publicación Internacional Número WO 02/091998), proteínas de
10 absorción de hierro (Publicación Internacional Número WO 01/72337), toxina A ó B de *C. difficile* (Publicación Internacional Número WO 00/61761) o proteína D (Patente Europea Número 594610 y Publicación Internacional Número WO 00/56360).

En una modalidad, la composición inmunogénica de la
15 invención utiliza el mismo tipo de proteína portadora (independientemente) en cuando menos dos, tres, cuatro, o cada uno de los sacáridos (por ejemplo, los sacáridos capsulares de *N. meningitidis*, y/o Hib) contenidos en la misma. En una modalidad en donde están presentes los sacáridos capsulares de *N. meningitidis* y
20 Hib, se puede conjugar Hib con el mismo tipo de proteína portadora que los cuando menos 2, 3, ó 4, o cada uno de los sacáridos *N. meningitidis*. Por ejemplo, se conjugan independientemente dos, tres, o cuatro de los sacáridos de *N. meningitidis* (Men A, C, Y, W) con toxoide de tétanos para hacer 2, 3, ó 4 conjugados, y opcionalmente
25 también se conjuga Hib con TT.

En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención comprende un sacárido de *N. meningitidis* conjugado con una proteína portadora seleccionada a partir del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, y proteína D. En una
5 modalidad, la composición inmunogénica de la invención comprende un sacárido de Hib conjugado con una proteína portadora seleccionada a partir del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, y proteína D.

La composición inmunogénica de la invención opcionalmente
10 comprende cuando menos un conjugado de sacárido meningocócico (por ejemplo, MenA; MenC; MenW; MenY; MenA y MenC; MenA y MenW; MenA y MenY; MenC y MenW; MenC y MenY; MenW y MenY; MenA, MenC y MenW; MenA, MenC, y MenY; MenA, MenW y MenY; MenC, MenW, y MenY, ó MenA, MenC, MenW y MenY) que tiene una
15 proporción del sacárido Men a la proteína portadora de entre 1:5 y 5:1, de entre 1:2 y 5:1, de entre 1:0.5 y 1:2.5, o de entre 1:1.25 y 1:2.5 (peso/peso).

La composición inmunogénica de la invención comprende opcionalmente un conjugado de sacárido de Hib que tiene una
20 proporción de Hib a la proteína portadora de entre 1:5 y 5:1, de entre 1:2 y 2:1; de entre 1:1 y 1:4; de entre 1:2 y 1:3.5; o de alrededor o exactamente 1:2.5 ó 1:3 (peso/peso).

La proporción del sacárido a la proteína portadora (peso/peso) en un conjugado se puede determinar utilizando el conjugado
25 esterilizado. La cantidad de proteína se determina utilizando un

ensayo de Lowry (por ejemplo, Lowry y colaboradores (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, o Peterson y colaboradores, *Analytical Biochemistry* 100, 201-220 (1979)), y la cantidad de sacárido se determina utilizando ICP-OES (espectroscopía de emisión óptica de plasma inductivamente acoplada) para MenA; el ensayo de DAMP para MenC, y el ensayo de resorcinol para MenW y MenY (Monsigny y colaboradores (1988) *Anal. Biochem.* 175, 525-530).

En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención comprende conjugados de sacáridos de *N. meningitidis* y/o el conjugado de sacárido de Hib, en donde los sacáridos de *N. meningitidis* y/o el sacárido de Hib se conjugan con la proteína portadora por medio de un enlazante, por ejemplo un enlazante bifuncional. Los enlazantes opcionalmente heterobifuncional y/u homobifuncional, teniendo, por ejemplo, un grupo amino reactivo y un grupo de ácido carboxílico reactivo, dos grupos amino reactivos, o dos grupos de ácido carboxílico reactivos. El enlazante tiene, por ejemplo, entre 4 y 20, entre 4 y 12, entre 5 y 10 átomos de carbono. Un posible enlazante es ADH. Otros enlazantes incluyen B-propionamido (Publicación Internacional Número WO 00/10599), nitro-fenil-etil-amina (Gever y colaboradores (1979) *Med. Microbiol. Immunol.* 165; 171-288), haluros de halo-alquilo (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US4057685), enlaces glicosídicos (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US4673574 y US4808700), diamina de hexano y ácido 6-amino-caproico (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica

Número US4459286).

Los conjugados de sacáridos presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden preparar mediante cualquier técnica de acoplamiento conocida. El método de conjugación se puede apoyar en la activación del sacárido con tetrafluoro-borato de 1-ciano-4-dimetil-amino-piridinio (CDAP), para formar un éster de cianato. Por lo tanto, el sacárido activado se puede acoplar directamente o por medio de un grupo espaciador (enlazante) con un grupo amino sobre la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina, para dar un polisacárido tiolado, el cual se podría acoplar con la portadora por medio de un enlace de tioéter obtenido después de la reacción con una proteína portadora activada por maleimida (por ejemplo, utilizando GMBS), o una proteína portadora halo-acetilada (por ejemplo, utilizando yodo-acetimidina o bromoacetato de bromoacetato de N-succinimidilo). Opcionalmente, el éster de cianato (opcionalmente hecho mediante química de CDAP) se acopla con hexan-diamina o ADH, y el sacárido amino-derivado se conjuga con la proteína portadora utilizando la química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC ó EDC) por medio de un grupo carboxilo sobre la proteína portadora. Estos conjugados se describen en la Solicitud Publicada del TCP Número WO 93/15760, Uniformed Services University, y en las Publicaciones Internacionales Números WO 95/08348 y WO 95/29094.

Otras técnicas adecuadas utilizan carbiinidas, hidrazidas,

ésteres activos, norborano, ácido p-nitro-benzoico, N-hidroxi-succinimida, S-NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la Publicación Internacional Número WO 98/42721. La conjugación puede involucrar un enlazante de carbonilo, el cual se puede formar
5 mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (Bethell y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 1979, 254; 2572-4; Hearn y colaboradores, *J. Chromatogr.* 1981, 218; 509-18), seguida por la reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Esto puede involucrar la reducción del término anomérico hasta un grupo
10 hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional de la reacción del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermediario de carbamato de CDI, y el acoplamiento del intermediario de carbamato de CDI con un grupo amino sobre una proteína.

15 Los conjugados también se pueden preparar mediante métodos de aminación reductiva directos, como se describen en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). Otros métodos se describen en las Patentes Europeas Números EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-
20 477508.

Un método adicional involucra el acoplamiento de un sacárido activado por bromuro de cianógeno (ó CDAP), derivado con hidrazida del ácido adípico (ADH), con la proteína portadora, mediante condensación de carbodimida (Chu C. y colaboradores, *Infect.*
25 *Immunity*, 1983 245-256), por ejemplo, utilizando EDAC.

En una modalidad, un grupo hidroxilo (opcionalmente un grupo hidroxilo activado, por ejemplo un grupo hidroxilo activado por un éster de cianato) sobre un sacárido, se enlaza con un grupo amino o carboxílico sobre una proteína, ya sea directa o indirectamente (a través de un enlazante). Cuando está presente un enlazante, un grupo hidroxilo sobre un sacárido opcionalmente se enlaza con un grupo amino sobre un enlazante, por ejemplo, utilizando conjugación de CDAP. Un grupo amino adicional del enlazante, por ejemplo ADH, se puede conjugar con un grupo de ácido carboxílico sobre una proteína, por ejemplo utilizando química de carbodimida, por ejemplo utilizando EDAC. En una modalidad, los sacáridos capsulares de Hib ó *N. meningitidis* (o los sacáridos en general), se conjugan primero con el enlazante antes de que se conjugue el enlazante con la proteína portadora. De una manera alternativa, el enlazante se puede conjugar con la portadora antes de la conjugación con el sacárido.

En general, se pueden utilizar los siguientes tipos de grupos químicos sobre una proteína portadora para el acoplamiento/la conjugación:

20 A) Carboxilo (por ejemplo, por medio de ácido aspártico o ácido glutámico). En una modalidad, este grupo se enlaza con los grupos amino de los sacáridos directamente, o con un grupo amino de un enlazante, con la química de carbodimida, por ejemplo con EDAC.

25 B) Grupo amino (por ejemplo, por medio de lisina). En una

modalidad, este grupo se enlaza con los grupos carboxilo de los
sacáridos directamente, o con un grupo carboxilo de un enlazante
con la química de carbodimida, por ejemplo con EDAC. En otra
modalidad, este grupo se enlaza con los grupos hidroxilo activados
5 con CDAP ó CNBr de los sacáridos directamente, o con estos grupos
de un enlazante; con los sacáridos o enlazantes que tengan un grupo
aldehído; con los sacáridos o enlazantes que tengan un grupo de
éster de succinimida.

C) Sulfhidrilo (por ejemplo, por medio de cisteína). En una
10 modalidad, este grupo se enlaza con un sacárido o enlazante bromo-
o cloro-acetilado, con la química de maleimida. En una modalidad,
este grupo se activa/se modifica con bis-diazobencidina.

D) Grupo hidroxilo (por ejemplo, por medio de tirosina). En
una modalidad, este grupo se activa/se modifica con bis-diazo-
15 bencidina.

E) Grupo imidazolilo (por ejemplo, por medio de histidina).
En una modalidad, este grupo se activa/se modifica con bis-
diazobencidina.

F) Grupo guanidilo (por ejemplo, por medio de arginina).

20 G) Grupo indolilo (por ejemplo, por medio de triptófano).

Sobre un sacárido, en general se pueden utilizar los siguientes
grupos para un acoplamiento: OH, COOH, ó NH₂. Se pueden generar
grupos aldehído después de diferentes tratamientos conocidos en la
técnica, tales como: peryodato, hidrólisis de ácido, peróxido de
25 hidrógeno, etc.

Planteamientos de acoplamiento directo:

Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH₂-Prot → conjugado.

5 Sacárido-aldehído + NH₂-Prot → base de Schiff + NaCNBH₃ → conjugado.

Sacárido-COOH + NH₂-Prot + EDAC → conjugado.

Sacárido-NH₂ + COOH-Prot + EDAC → conjugado.

Planteamientos de acoplamiento indirecto por medio de un espaciador (enlazante):

10 Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH₂—NH₂ → sacárido—NH₂ + COOH-Prot + EDAC → conjugado.

15 Sacárido-OH + CNBr o CDAP → éster de cianato + NH₂—SH → sacárido—SH + SH-Prot (proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida después de la modificación de los grupos amino de la proteína mediante SPDP, por ejemplo) → sacárido-S-S-Prot.

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

20 Sacárido-COOH + EDAC + NH₂—NH₂ → sacárido—NH₂ + EDAC + COOH-Prot → conjugado.

25 Sacárido-COOH + EDAC + NH₂—SH → sacárido—SH + SH-Prot (proteína nativa con una cisteína expuesta u obtenida después de la modificación de los grupos amino de la proteína mediante SPDP, por ejemplo) → sacárido-S-S-Prot.

Sacárido-COOH + EDAC + NH₂-SH → sacárido-SH + maleimida-Prot (modificación de los grupos amino) → conjugado.

Sacárido-aldehído + NH₂-NH₂ → sacárido-NH₂ + EDAC + COOH-Prot → conjugado.

5 Nota: En lugar de EDAC anteriormente, se puede utilizar cualquier carbodimida adecuada.

En resumen, los tipos de grupos químicos de proteínas portadoras que se pueden utilizar en general para el acoplamiento con un sacárido son los grupos amino (por ejemplo, sobre los
10 residuos de lisina), los grupos COOH (por ejemplo, sobre los residuos de ácido aspártico y ácido glutámico), y los grupos SH (si son accesibles) (por ejemplo, sobre los residuos de cisteína).

En una modalidad, el sacárido de Hib, cuando está presente, se conjuga con la proteína portadora utilizando CNBr, o CDAP, o una
15 combinación de CDAP y la química de carboxi-imida (tal como EDAC), o una combinación de CNBr y la química de carbodimida (tal como EDAC). Opcionalmente, Hib se conjuga utilizando CNBr y la química de carbodimida, opcionalmente EDAC. Por ejemplo, se
20 utiliza CNBr para unir el sacárido y el enlazante, y luego se utiliza la química de carbodimida para unir el enlazante con la proteína portadora.

En una modalidad, cuando menos uno de los sacáridos capsulares de *N. meningitidis* (o los sacáridos en general) se conjuga directamente con una proteína portadora; opcionalmente se
25 conjugan los sacáridos MenW y/o MenY y/o MenC directamente con

una proteína portadora. Por ejemplo, se enlazan directamente MenW; MenY; MenC; MenW y MenY; MenW y MenC; MenY y MenC; o MenW, MenY y MenC, con la proteína portadora. Opcionalmente, cuando menos uno de los sacáridos capsulares de *N. meningitidis* se conjuga
5 directamente mediante CDAP. Por ejemplo, MenW; MenY; MenC; MenW y MenY; MenW y MenC; MenY y MenC; o MenW, MenY, y MenC, se enlazan directamente con la proteína portadora mediante CDAP (véanse las Publicaciones Internacionales Números WO 95/08348 y WO 96/29094). En una modalidad, todos los sacáridos
10 capsulares de *N. meningitidis* se conjugan con el toxoide de tétanos.

En una modalidad, la proporción del sacárido MenW y/o Y a la proteína portadora es de entre 1:0.5 y 1:2 (peso/peso), y/o la proporción del sacárido MenC a la proteína portadora es de entre 1:0.5 y 1:4, o de entre 1:0.5 y 1:1.5 (peso/peso), en especial en
15 donde estos sacáridos se enlazan directamente con la proteína, utilizando opcionalmente CDAP.

En una modalidad, cuando menos uno de los sacáridos capsulares de *N. meningitidis* (o los sacáridos en general) se conjuga con la proteína portadora por medio de un enlazante, por
20 ejemplo un enlazante bifuncional. El enlazante opcionalmente es heterobifuncional u homobifuncional, teniendo, por ejemplo, un grupo amina reactivo y un grupo de ácido carboxílico reactivo, dos grupos amina reactivos o dos grupos de ácido carboxílico reactivos. El enlazante, por ejemplo, tiene entre 4 y 20, entre 4 y 12, entre 5 y 10
25 átomos de carbono. Un posible enlazante es ADH.

En una modalidad, se conjuga MenA; MenC; o MenA y MenC, con una proteína portadora (por ejemplo, toxoide de tétanos) por medio de un enlazante.

En una modalidad, se conjuga cuando menos un sacárido de *N. meningitidis* con una proteína portadora por medio de un enlazante, utilizando CDAP y EDAC. Por ejemplo, MenA; MenC; o MenA y MenC se conjugan con una proteína por medio de un enlazante (por ejemplo, aquéllos con dos grupos hidrazino en sus extremos, tales como ADH), utilizando CDAP y EDAC, como se describe anteriormente. Por ejemplo, se utiliza CDAP para conjugar el sacárido con un enlazante; y se utiliza EDAC para conjugar el enlazante con una proteína. Opcionalmente, la conjugación por medio de un enlazante da como resultado una proporción del sacárido a la proteína portadora de entre 1:0.5 y 1:6; de entre 1:1 y 1:5, o de entre 1:2 y 1:4, para MenA; MenC; o MenA y MenC.

En una modalidad, el sacárido capsular MenA, cuando está presente, está cuando menos parcialmente O-acetilado, de tal manera que cuando menos el 50 por ciento, el 60 por ciento, el 70 por ciento, el 80 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento, o el 98 por ciento de las unidades de repetición están O-acetiladas cuando menos en una posición. La O-acetilación, por ejemplo, está presente cuando menos en la posición O-3 de cuando menos el 50 por ciento, el 60 por ciento, el 70 por ciento, el 80 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento, o el 98 por ciento de las unidades de repetición.

En una modalidad, el sacárido capsular MenC, cuando está

presente, está cuando menos parcialmente O-acetilado, de tal manera que cuando menos el 30 por ciento, el 40 por ciento, el 50 por ciento, el 60 por ciento, el 70 por ciento, el 80 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento, o el 98 por ciento de las unidades de repetición NeuNAc enlazadas con $(\alpha 2-9) \rightarrow$ están O-acetiladas en cuando menos una o dos posiciones. La O-acetilación está presente, por ejemplo, en la posición O-7 y/u O-8 de cuando menos el 30 por ciento, el 40 por ciento, el 50 por ciento, el 60 por ciento, el 70 por ciento, el 80 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento, o el 98 por ciento de las unidades de repetición.

En una modalidad, el sacárido capsular MenW, cuando está presente, está cuando menos parcialmente O-acetilado, de tal manera que cuando menos el 30 por ciento, el 40 por ciento, el 50 por ciento, el 60 por ciento, el 70 por ciento, el 80 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento, o el 98 por ciento de las unidades de repetición están O-acetiladas en cuando menos una o dos posiciones. La O-acetilación está presente, por ejemplo, en la posición O-7 y/u O-9 de cuando menos el 30 por ciento, el 40 por ciento, el 50 por ciento, el 60 por ciento, el 70 por ciento, el 80 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento, o el 98 por ciento de las unidades de repetición.

En una modalidad, el sacárido capsular MenY, cuando está presente, está cuando menos parcialmente O-acetilado, de tal manera que cuando menos el 20 por ciento, el 30 por ciento, el 40 por ciento, el 50 por ciento, el 60 por ciento, el 70 por ciento, el 80

por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento, o el 98 por ciento de las unidades de repetición están O-acetiladas en cuando menos una o dos posiciones. La O-acetilación está presente en la posición 7 y/o 9 de cuando menos el 20 por ciento, el 30 por ciento, el 40 por ciento, el 50 por ciento, el 60 por ciento, el 70 por ciento, el 80 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento, o el 98 por ciento de las unidades de repetición.

El porcentaje de O-acetilación se refiere al porcentaje de las unidades de repetición que contienen O-acetilación. Esto se puede medir en el sacárido antes de conjugarse, y/o después de la conjugación.

En una modalidad de la invención, la composición inmunogénica, el sacárido presente, o cada sacárido capsular de *N. meningitidis* presente, se conjuga con TT. En una modalidad adicional, cada sacárido capsular de *N. meningitidis* se conjuga por separado con una proteína portadora separada. En una modalidad adicional, cada conjugado de sacárido capsular de *N. meningitidis* tiene una proporción del sacárido:portadora de 1:5 a 5:1, o de 1:1 a 1:4 (peso/peso). En una modalidad adicional, cuando menos uno, dos, o tres conjugados de sacáridos capsulares de *N. meningitidis* se conjugan directamente con una proteína portadora. En una modalidad adicional, MenW y/o MenY, MenW y/o MenC, MenY y/o MenC, o MenW y MenC y MenY, se conjugan directamente con una proteína portadora. En una modalidad adicional, cuando menos uno, dos, o tres conjugados de sacáridos de *N. meningitidis* se conjugan

directamente mediante la química de CDAP. En una modalidad adicional, la proporción del sacárido MenW y/o MenY a la proteína portadora es de entre 1:0.5 y 1:2 (peso/peso). En una modalidad adicional, la proporción del sacárido MenC a la proteína portadora es de entre 1:0.5 y 1:2 (peso/peso). En una modalidad adicional, cuando menos uno, dos, o tres sacáridos capsulares de *N. meningitidis* se conjugan con la proteína portadora por medio de un enlazante (el cual puede ser bifuncional, tal como teniendo dos grupos amino reactivos (tales como ADH), o dos grupos carboxilo reactivos, o un grupo amino reactivo en un extremo y un grupo carboxilo reactivo en el otro). El enlazante puede tener entre 4 y 12 átomos de carbono. En una modalidad adicional, el o cada sacárido capsular de *N. meningitidis* conjugado por medio de un enlazante se conjuga con el enlazante con la química de CDAP. En una modalidad adicional, la proteína portadora se conjuga con el enlazante utilizando la química de carbodimida, por ejemplo, utilizando EDAC. En una modalidad adicional, el o cada sacárido capsular de *N. meningitidis* se conjuga con el enlazante antes de que se conjugue la proteína portadora con el enlazante. En una modalidad adicional, se conjuga MenA con una proteína portadora por medio de un enlazante (la proporción del sacárido MenA a la proteína portadora puede ser de entre 1:2 y 1:5 (peso/peso)). En una modalidad adicional, se conjuga MenC con una proteína portadora por medio de un enlazante (la proporción del sacárido MenC a la proteína portadora puede ser de entre 1:2 y 1:5 (peso/peso)).

Los inventores también han observado que el enfoque de la técnica ha sido utilizar oligosacáridos para una facilidad de producción de conjugados. Los inventores han encontrado que, mediante la utilización de conjugados de polisacáridos nativos o
5 ligeramente dimensionados, se pueden hacer realidad una o más de las siguientes ventajas: 1) un conjugado que tiene una alta inmunogenicidad que se puede filtrar a través de un filtro de 0.2 micras; 2) se puede mejorar la memoria inmune (como en el Ejemplo 3); 3) la alteración de la proporción del polisacárido a la proteína en
10 el conjugado, de tal manera que la proporción del polisacárido a la proteína (peso/peso) en el conjugado se puede aumentar (esto puede dar como resultado una reducción del efecto de supresión de la portadora); 4) los conjugados inmunogénicos susceptibles a hidrólisis (tales como los conjugados de MenA) se pueden estabilizar
15 mediante el uso de polisacáridos más grandes para la conjugación. El uso de polisacáridos más grandes puede dar como resultado mayor reticulación con la portadora conjugada, y puede disminuir la liberación de sacárido libre desde el conjugado. Las vacunas conjugadas descritas en la técnica anterior tienden a despolimerizar
20 los polisacáridos antes de la conjugación, con el objeto de mejorar la conjugación. Los presentes inventores han encontrado que las vacunas conjugadas meningocócicas (o de sacáridos) que retengan un mayor tamaño del sacárido, pueden proporcionar una buena respuesta inmune contra la enfermedad meningocócica.

25 La composición inmunogénica de la invención, por lo tanto,

puede comprender uno o más conjugados de sacáridos, en donde el tamaño promedio de cada sacárido antes de la conjugación es mayor de 50 kDa, de 75 kDa, de 100 kDa, de 110 kDa, de 120 kDa, o de 130 kDa. En una modalidad, el conjugado después de la conjugación
5 debe ser fácilmente filtrable a través de un filtro de 0.2 micras, de tal manera que se obtenga un rendimiento de más del 50, del 60, del 70, del 80, del 90, o del 95 por ciento después de la filtración, comparándose con la muestra antes de la filtración.

En particular, la composición inmunogénica de la invención
10 comprende sacáridos capsulares de *N. meningitidis* a partir de cuando menos uno, dos, tres, o cuatro de los serogrupos A, C, W, e Y, conjugados con una proteína portadora, en donde el tamaño promedio (peso molecular promedio en peso; Mw) de cuando menos uno, dos, tres, o cuatro de cada sacárido de *N. meningitidis* es mayor
15 de 50 kDa, 60 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa, ó 130 kDa.

La composición inmunogénica puede comprender sacáridos capsulares de *N. meningitidis* a partir de cuando menos uno, dos, tres, o cuatro de los serogrupos A, C, W, e Y, conjugados con una proteína portadora, en donde cuando menos uno, dos, tres, o cuatro
20 o cada uno de los sacáridos de *N. meningitidis*, es un sacárido nativo o está dimensionado por un factor de hasta x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9, o x10 en relación con el peso molecular promedio en peso del polisacárido nativo.

Para los propósitos de la invención, "polisacárido nativo" se
25 refiere a un sacárido que no se ha sometido a un proceso, cuyo

propósito sea reducir el tamaño del sacárido. Un polisacárido se puede llevar a reducir ligeramente en su tamaño durante los procedimientos de purificación normales. Este sacárido todavía es nativo. Solamente si el polisacárido se ha sometido a técnicas de dimensionamiento, entonces el polisacárido no se consideraría nativo.

Para los propósitos de la invención, "dimensionado por un factor de hasta x2" significa que el sacárido se somete a un proceso pretendido para reducir el tamaño del sacárido, pero para retener un tamaño mayor de la mitad del tamaño del polisacárido nativo. x3, x4, etc. se deben interpretar de la misma manera, es decir, el sacárido se somete a un proceso pretendido para reducir el tamaño del polisacárido, pero para retener un tamaño mayor de una tercera parte, una cuarta parte, etc., del tamaño del polisacárido nativo.

En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos capsulares de *N. meningitidis* a partir de cuando menos uno, dos, tres, o cuatro de los serogrupos A, C, W, e Y conjugados con una proteína portadora, en donde cuando menos uno, dos, tres, o cuatro o cada sacárido de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo.

En un aspecto de la invención, la composición inmunogénica comprende sacáridos capsulares de *N. meningitidis* a partir de cuando menos uno, dos, tres, o cuatro de los serogrupos A, C, W, e Y, conjugados con una proteína portadora, en donde cuando menos uno, dos, tres, o cuatro o cada sacárido de *N. meningitidis* se

dimensiona por un factor de hasta x1.5, x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9, ó x10.

Las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden opcionalmente conjugados de: sacárido capsular del serogrupo C de
5 *N. meningitidis* (MenC), sacárido capsular del serogrupo A (MenA), sacárido capsular del serogrupo W135 (MenW), sacárido capsular del serogrupo Y (MenY), sacáridos capsulares de los serogrupos C e Y (MenCY), sacáridos capsulares de los serogrupos C y A (MenAC), sacáridos capsulares de los serogrupos C y W (MenCW), sacáridos
10 capsulares de los serogrupos A e Y (MenAY), sacáridos capsulares de los serogrupos A y W (MenAW), sacáridos capsulares de los serogrupos W e Y (MenWY), sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, y W (MenACW), sacáridos capsulares de los serogrupos AC, C, e Y (MenACY); sacáridos capsulares de los serogrupos A, W135 e Y
15 (MenAWY), sacáridos capsulares de los serogrupos C, W135, e Y (MenCWY); o sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135, e Y (MenACWY). Ésta es la definición de "uno, dos, tres, o cuatro", o "cuando menos uno de" de los serogrupos A, C, W, e Y, o de cada sacárido de *N. meningitidis*, cuando se mencionan en la presente.

20 En una modalidad, tamaño promedio de cuando menos uno, dos, tres, o cuatro o cada sacárido de *N. meningitidis* es de entre 50 kDa y 1,500 kDa, de entre 50 kDa y 500 kDa, de entre 50 kDa y 300 kDa, de entre 101 kDa y 1,500 kDa, de entre 101 kDa y 500 kDa, de entre 101 kDa y 300 kDa, como se determine mediante MALLS.

25 En una modalidad, el sacárido MenA, cuando está presente,

tiene un peso molecular de 50 a 500 kDa, de 50 a 100 kDa, de 100 a 500 kDa, de 55 a 90 kDa, de 60 a 70 kDa, o de 70 a 80 kDa o de 60 a 80 kDa.

En una modalidad, el sacárido MenC, cuando está presente,
5 tiene un peso molecular de 100 a 200 kDa, de 50 a 100 kDa, de 100 a 150 kDa, de 110 a 130 kDa, de 150 a 210 kDa, o de 180 a 210 kDa.

En una modalidad, el sacárido MenY, cuando está presente,
tiene un peso molecular de 60 a 190 kDa, de 70 a 180 kDa, de 80 a 170 kDa, de 90 a 160 kDa, de 100 a 150 kDa, o de 110 a 140 kDa, de
10 50 a 100 kDa, de 100 a 140 kDa, de 140 a 170 kDa, o de 150 a 160 kDa.

En una modalidad, el sacárido MenW, cuando está presente,
tiene un peso molecular de 60 a 190 kDa, de 70 a 180 kDa, de 80 a 170 kDa, de 90 a 160 kDa,, de 100 a 150 kDa, de 110 a 140 kDa, de
15 50 a 100 kDa, o de 120 a 140 kDa.

El peso molecular, o el peso molecular promedio de un sacárido, se refiere en la presente al peso molecular promedio en peso (Mw) del sacárido, medido antes de la conjugación, y se mide mediante MALLS.

20 La técnica MALLS es bien conocida en este campo, y típicamente se lleva a cabo como se describe en el Ejemplo 2. Para el análisis MALLS de los sacáridos meningocócicos, se pueden utilizar dos columnas (TSKG6000 y 5000PWxl) en combinación, y los sacáridos se eluyen en agua. Los sacáridos se detectan utilizando un
25 detector de dispersión de luz (por ejemplo, Wyatt Dawn DSP

equipado con un dispositivo de láser de argón de 10 mW a 488 nanómetros), y un refractómetro interferométrico (por ejemplo, Wyatt Otilab DSP, equipado con una celda P100, y un filtro rojo a 498 nanómetros).

5 En una modalidad, los sacáridos de *N. meningitidis* son polisacáridos nativos, o polisacáridos nativos que se han reducido en su tamaño durante un proceso de extracción normal.

 En una modalidad, los sacáridos de *N. meningitidis* se dimensionan mediante disociación mecánica, por ejemplo mediante
10 microfluidización o sonicación. La microfluidización y sonicación tienen la ventaja de disminuir el tamaño de los polisacáridos nativos más grandes suficientemente para proporcionar un conjugado filtrable (por ejemplo, a través de un filtro de 0.2 micras). El dimensionamiento es por un factor no mayor de x20, x10, x8, x6, x5,
15 x4, x3, x2, ó x1.5.

 En una modalidad, la composición inmunogénica comprende conjugados de *N. meningitidis* que se hacen a partir de una mezcla de polisacáridos nativos y sacáridos que se dimensionan por un factor de no más de x20. Por ejemplo, los sacáridos a partir de MenC
20 y/o MenA son nativos. Por ejemplo, los sacáridos de MenY y/o MenW se dimensionan por un factor no mayor de x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, ó x2. Por ejemplo, una composición inmunogénica comprende un conjugado hecho de MenY y/o MenW y/o MenC y/o MenA, que se dimensiona por un factor no mayor de x10, y/o se microfluidiza. Por
25 ejemplo, una composición inmunogénica contiene un conjugado

hecho de MenA y/o MenC y/o MenW y/o MenY nativos. Por ejemplo, una composición inmunogénica comprende un conjugado hecho de MenC nativo. Por ejemplo, una composición inmunogénica comprende un conjugado hecho de MenC nativo y MenA que se dimensiona por un factor no mayor de x10, y/o se microfluidiza. Por ejemplo, una composición inmunogénica comprende un conjugado hecho de MenC nativo y MenY que se dimensiona por un factor no mayor de x10 y/o se microfluidiza.

En una modalidad, la polidispersidad del sacárido es de 1 a 1.5, de 1 a 1.3, de 1 a 1.2, de 1 a 1.1, o de 1 a 1.05, y después de la conjugación con una proteína portadora, la polidispersidad del conjugado es de 1.0 a 2.5, de 1.0 a 2.0, de 1.0 a 1.5, de 1.0 a 1.2, de 1.5 a 2.5, de 1.7 a 2.2, o de 1.5 a 2.0. Todas las mediciones de polidispersidad son mediante MALLS.

Los sacáridos opcionalmente se dimensionan hasta 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, ó 20 veces desde el tamaño del polisacárido aislado de la bacteria.

En una modalidad, cada sacárido de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo, o bien se dimensiona por un factor no mayor de x10. En una modalidad adicional, cada sacárido capsular de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo. En una modalidad adicional, cuando menos uno, dos, tres, o cuatro sacáridos capsulares de *N. meningitidis* se dimensionan mediante microfluidización. En una modalidad adicional, cada sacárido capsular de *N. meningitidis* se dimensiona por un factor no mayor de x10. En una modalidad

composición inmunogénica comprende un sacárido capsular MenW que tiene un tamaño promedio mayor de 50 kDa, de 75 kDa, o de entre 60 y 190 kDa, de entre 70 y 180 kDa, de entre 80 y 170 kDa, o de entre 90 y 160 kDa, o de entre 100 y 150 kDa, o de entre 140 y 180 kDa, de entre 150 y 170 kDa, o de entre 110 y 140 kDa.

La composición inmunogénica de la invención puede comprender un sacárido capsular de *H. influenzae* b (Hib) conjugado con una proteína portadora. Éste se puede conjugar con una proteína portadora seleccionada a partir del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, y proteína D, por ejemplo TT. El sacárido de Hib se puede conjugar con la misma proteína portadora que cuando menos uno, dos, tres, o todos los conjugados de sacáridos capsulares de *N. meningitidis*, por ejemplo TT. La proporción de Hib a la proteína portadora en el conjugado de sacárido capsular de Hib, puede ser de entre 1:5 y 5:1 (peso/peso), por ejemplo de entre 1:1 y 1:4, de entre 1:2 y 1:3.5, o de alrededor de 1:3 (peso/peso). El sacárido capsular de Hib se puede conjugar con la proteína portadora por medio de un enlazante (véase anteriormente). El enlazante puede ser bifuncional (con dos grupos amino reactivos, tales como ADH, o dos grupos de ácido carboxílico reactivos, o un grupo amino reactivo en un extremo, y un grupo de ácido carboxílico reactivo en el otro extremo). Puede tener entre 4 y 12 átomos de carbono. El sacárido de Hib se puede conjugar con la proteína portadora o con el enlazante utilizando CNBr ó CDAP. La proteína portadora se puede conjugar con el sacárido de Hib por

medio del enlazante, empleando un método que comprenda la química de carbodimida, por ejemplo la química de EDAC (y por lo tanto, utilizando el grupo químico de carboxilo sobre la portadora). La dosis del conjugado de sacárido de Hib puede ser de entre 0.1 y 9 microgramos, de entre 1 y 5 microgramos, o de entre 2 y 3 microgramos del sacárido.

En una modalidad adicional, la composición inmunogénica de la invención comprende un conjugado de sacárido de Hib, y cuando menos dos conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*, en donde el conjugado de Hib está presente en una dosis de sacárido más baja que la dosis de sacárido promedio de los cuando menos dos conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*. De una manera alternativa, el conjugado de Hib está presente en una dosis de sacárido más baja que la dosis de sacárido de cada uno de los cuando menos dos conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*. Por ejemplo, la dosis del conjugado de Hib puede ser cuando menos el 10 por ciento, el 20 por ciento, el 30 por ciento, el 40 por ciento, el 50 por ciento, el 60 por ciento, el 70 por ciento, o el 80 por ciento más baja que la dosis de sacárido promedio o más baja de los cuando menos dos conjugados de sacáridos de *N. meningitidis* adicionales.

La dosis promedio se determina sumando las dosis de todos los sacáridos adicionales, y dividiendo entre el número de sacáridos adicionales. Los sacáridos adicionales son todos los sacáridos dentro de la composición inmunogénica, aparte del Hib, y pueden

incluir los sacáridos capsulares de *N. meningitidis*. La "dosis" es la cantidad de composición inmunogénica o vacuna que se administra a un ser humano.

Un sacárido de Hib es el polisacárido capsular de poli-fosfato de ribosilo de *Haemophilus influenzae* tipo b, o un oligosacárido derivado del mismo.

Cuando menos dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales significan dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales, en adición a un conjugado de Hib. Los dos conjugados bacterianos adicionales pueden incluir los conjugados de sacáridos capsulares de *N. meningitidis*.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender conjugados de sacáridos adicionales derivados a partir de uno o más de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, Estreptococos Grupo A, Estreptococos Grupo B, *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* ó *Staphylococcus epidermis*. En una modalidad, la composición inmunogénica comprende sacáridos capsulares derivados a partir de uno o más de los serogrupos A, C, W135, e Y de *Neisseria meningitidis*. Una modalidad adicional comprende sacáridos capsulares derivados a partir de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de sacáridos capsulares neumocócicos se seleccionan opcionalmente a partir de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, y 33F (opcionalmente a partir de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F). Una modalidad adicional

comprende los sacáridos capsulares Tipo 5, Tipo 8, o 336, de *Staphylococcus aureus*. Una modalidad adicional comprende los sacáridos capsulares Tipo I, Tipo II, o Tipo III de *Staphylococcus epidermidis*. Una modalidad adicional comprende el sacárido Vi de *S. typhi*. Una modalidad adicional comprende los sacáridos capsulares Tipo Ia, Tipo Ic, Tipo II, Tipo III, o Tipo V de estreptococos del Grupo B. Una modalidad adicional comprende los sacáridos capsulares de estreptococos del Grupo A, opcionalmente comprendiendo además cuando menos una proteína M, y opcionalmente múltiples tipos de proteína M.

Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden comprender una vacuna de DTPa ó DTPw (por ejemplo, una que contenga DT, TT, y ya sea una vacuna de tosferina de células enteras (Pw), o bien una vacuna de tosferina acelular (Pa) (comprendiendo, por ejemplo, toxoide de tosferina, FHA, pertactina, y opcionalmente aglutinóginas 2 y 3). Estas combinaciones también pueden comprender una vacuna contra hepatitis B (por ejemplo, pueden comprender antígeno superficial de hepatitis B [HepB], opcionalmente adsorbido sobre fosfato de aluminio). En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención comprende una vacuna de DTPwHepBHibMenAC, en donde el componente HibMenAC es como se describe anteriormente.

Las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden opcionalmente antígenos virales adicionales que confieren protección contra la enfermedad causada por sarampión y/o paperas y/o rubéola

y/o varicela. Por ejemplo, la composición inmunogénica de la invención contiene antígenos de sarampión, paperas, y rubéola (MMR), o de sarampión, paperas, rubéola y varicela (MMRV). En una modalidad, estos antígenos virales están opcionalmente presentes en el mismo recipiente que los conjugados meningocócicos y/o de sacáridos de Hib. En una modalidad, estos antígenos virales están liofilizados.

En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención comprende además un antígeno de *N. meningitidis* serogrupo B. El antígeno es opcionalmente un polisacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo B (MenB), o un polisacárido dimensionado u oligosacárido derivado del mismo, el cual se puede conjugar con una proteína portadora. El antígeno es opcionalmente una preparación de vesícula de membrana externa de *N. meningitidis* serogrupo B, como se describe en las Patentes Números EP301992, WO 01/09350, WO 04/14417, WO 04/14418, y WO 04/14419.

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

En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención contiene cada sacárido capsular de *N. meningitidis* en una dosis de entre 0.1 y 20 microgramos; de entre 1 y 10 microgramos; de entre 2 y 10 microgramos; de entre 2.5 y 5 microgramos; de alrededor o exactamente 5 microgramos; o de alrededor o

exactamente 2.5 microgramos. En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención comprende MenA, MenC, MenW, y MenY (opcionalmente conjugados con toxoide de tétanos), en dosis de 2.5, 2.5, 2.5, 2.5, y 2.5 microgramos, respectivamente, de 5, 5, 5, y 5 microgramos, respectivamente, o de 5, 5, 2.5 y 2.5 microgramos, respectivamente.

En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención, por ejemplo, contiene al conjugado de sacárido de Hib en una dosis de sacárido de entre 0.1 y 9 microgramos; de entre 1 y 5 microgramos, o de entre 2 y 3 microgramos, o en alrededor o exactamente 2.5 microgramos. En una modalidad adicional, la composición inmunogénica de la invención contiene, por ejemplo, al conjugado de sacárido de Hib en una dosis de sacárido de entre 0.1 y 9 microgramos; de entre 1 y 5 microgramos, o de entre 2 y 3 microgramos, o de alrededor o exactamente 2.5 microgramos, y cada uno de los conjugados de polisacáridos de *N. meningitidis* en una dosis de sacárido de entre y 20 microgramos, de entre 3 y 10 microgramos, o de entre 4 y 7microgramos, o de alrededor o exactamente 5 microgramos.

“Alrededor” o “aproximadamente” se definen como dentro del 10 por ciento más o menos de la cifra dada para los propósitos de la invención.

En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención puede contener una dosis de sacárido del conjugado de sacárido de Hib que sea, por ejemplo, menor del 90 por ciento, del

80 por ciento, del 75 por ciento, del 70 por ciento, del 60 por ciento, del 50 por ciento, del 40 por ciento, del 30 por ciento, del 20 por ciento, o del 10 por ciento de la dosis de sacárido promedio de cuando menos dos, tres, cuatro, o cada uno de los conjugados de
5 sacáridos de *N. meningitidis*. La dosis de sacárido del sacárido de Hib es, por ejemplo, de entre el 20 por ciento y el 60 por ciento, de entre el 30 por ciento y el 60 por ciento, de entre el 40 y el 60 por ciento, o de alrededor o exactamente del 50 por ciento del sacárido promedio de cuando menos dos, tres, cuatro, o cada uno de los
10 conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*.

En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención contiene una dosis de sacárido del conjugado de sacárido de Hib que es, por ejemplo, menor del 90 por ciento, del 80 por ciento, del 75 por ciento, del 70 por ciento, del 60 por ciento, del 50
15 por ciento, del 40 por ciento, del 30 por ciento, del 20 por ciento, o del 10 por ciento de la dosis de sacárido más baja de los cuando menos dos, tres, cuatro, o cada uno de los conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*. La dosis de sacárido del sacárido de Hib es, por ejemplo, de entre el 20 por ciento y el 60 por ciento, de entre el 30
20 por ciento y el 60 por ciento, de entre el 40 por ciento y el 60 por ciento, o de alrededor o exactamente el 50 por ciento de la dosis de sacárido más baja de los cuando menos dos, tres, cuatro, o cada uno de los conjugados de sacáridos de *N. meningitidis*.

En una modalidad de la invención, la dosis de sacárido de cada
25 uno de los cuando menos dos, tres, cuatro, o cada uno de los

conjugados de sacáridos de *N. meningitidis* es opcionalmente igual, o aproximadamente igual.

Los ejemplos de las composiciones inmunogénicas de la invención, son las composiciones que consisten en, o que
5 comprenden:

Un conjugado de Hib y un conjugado de MenA y un conjugado de MenC, opcionalmente en proporciones de dosis de sacáridos de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (peso/peso). Opcionalmente, la dosis de sacárido de MenA es mayor que la dosis
10 de sacárido de MenC.

Un conjugado de Hib y un conjugado de MenC y un conjugado de MenY, opcionalmente en proporciones de dosis de sacáridos de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (peso/peso). Opcionalmente, la dosis de sacárido de MenC es mayor
15 que la dosis de sacárido de MenY.

Un conjugado de Hib y un conjugado de MenC y un conjugado de MenW, opcionalmente en proporciones de dosis de sacáridos de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (peso/peso). Opcionalmente la dosis de sacárido de MenC es mayor
20 que la dosis de sacárido de MenW.

Un conjugado de Hib y un conjugado de MenA y un conjugado de MenW, opcionalmente en proporciones de dosis de sacáridos de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (peso/peso). Opcionalmente, la dosis de sacárido de MenA es mayor
25 que la dosis de sacárido de MenW.

Un conjugado de Hib y un conjugado de MenA y un conjugado de MenY, opcionalmente en proporciones de dosis de sacáridos de 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (peso/peso). Opcionalmente la dosis de sacárido de MenA es mayor
5 que la dosis de sacárido de MenY.

Un conjugado de Hib y un conjugado de MenW y un conjugado de MenY, opcionalmente en proporciones de dosis de sacáridos de 1:2:2, 1:2:1, 1:1:2, 1:4:2, 1:2:4, 1:4:1, 1:1:4, 1:3:6, 1:1:3, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (peso/peso). Opcionalmente la dosis de
10 sacárido de MenY es mayor que la dosis de sacárido de MenW.

MenA, MenC, MenW, y MenY, en proporciones de dosis de sacáridos de 1:1:1:1 o de 2:1:1:1 o de 1:2:1:1 o de 2:2:1:1 o de 1:3:1:1 o de 1:4:1:1 (peso/peso).

Un aspecto adicional de la invención es una vacuna que
15 comprende la composición inmunogénica de la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención se ajusta o se regula hasta entre un pH de 7.0 y 8.0, un pH de 7.2 y 7.6, o alrededor o exactamente un pH de 7.4.

20 La composición inmunogénica o las vacunas de la invención opcionalmente se liofilizan 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
25 mejorar la respuesta inmune al inmunógeno. Los adyuvantes

adecuados incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), mezclas de escualeno (SAF-1), péptido de muramilo, derivados de saponina, preparaciones de pared celular de micobacterias, monofosforil-lípido A, derivados de ácido micólico, tensoactivos de copolímeros de bloques no iónicos, Quil A, subunidad B de toxina de cólera, polifosfaceno y derivados, y complejos inmunoestimulantes (ISCOMs), tales como los descritos por Takahashi y colaboradores (1990) *Nature* 344:873-875.

Para las combinaciones de *N. meningitidis* o HibMen discutidas anteriormente, puede ser conveniente no utilizar ningún adyuvante de sal de aluminio, o ningún adyuvante en general.

Como con todas las composiciones inmunogénicas o vacunas, las cantidades inmunológicamente efectivas de los inmunógenos se deben determinar empíricamente. Los factores que se deben considerar incluyen la inmunogenicidad, ya sea o no que el inmunógeno vaya a formar complejo con, o se vaya a unir covalentemente a, un adyuvante o a una proteína portadora o a otro portador, las vías de administración, y el número de dosificaciones inmunizantes que se vayan a administrar.

El agente activo puede estar presente en diferentes concentraciones en la composición farmacéutica o en la vacuna de la invención. Típicamente, la concentración mínima de la sustancia es una cantidad necesaria para lograr su uso pretendido, mientras que la concentración máxima es la cantidad máxima que permanecerá en solución u homogéneamente suspendida dentro de la mezcla inicial.

Por ejemplo, la cantidad mínima de un agente terapéutico, es opcionalmente una que proporcione una sola dosificación terapéuticamente efectiva. Para las sustancias bioactivas, la concentración mínima es una cantidad necesaria para la bioactividad después de la reconstitución, y la concentración máxima está en el punto en donde no se puede mantener una suspensión homogénea. En el caso de las unidades de una sola dosis, la cantidad es aquella de una sola aplicación terapéutica. En términos generales, se espera que cada dosis comprenderá de 1 a 100 microgramos de antígeno de proteína, por ejemplo de 5 a 50 microgramos, o de 5 a 25 microgramos. Por ejemplo, las dosis de los sacáridos bacterianos son de 10 a 20 microgramos, de 5 a 10 microgramos, de 2.5 a 5 microgramos, o de 1 a 2.5 microgramos de sacárido en el conjugado.

Las preparaciones de vacuna de la presente invención se pueden utilizar para proteger o tratar a un mamífero (por ejemplo, a un paciente humano) susceptible a la infección, por medio de la administración de la vacuna mediante la vía sistémica o mucosa. Un paciente humano es opcionalmente un bebé (de menos de 12 meses de edad), un niño que empieza a andar (de 12 a 24, o de 12 a 16, o de 12 a 14 meses de edad), un niño (de 2 a 10, de 3 a 8, o de 3 a 5 años de edad), un adolescente (de 12 a 21, de 14 a 20, o de 15 a 19 años de edad), o un adulto. Estas administraciones pueden incluir inyección mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, o subcutánea; o mediante administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Se prefiere la

administración intranasal de las vacunas para el tratamiento de
neumonía u otitis media (debido a que se puede prevenir más
efectivamente la portación nasofaríngea de neumococos, atenuando
de esta manera la infección en su etapa más temprana). Aunque la
5 vacuna de la invención se puede administrar como una sola dosis,
los componentes de la misma también se pueden co-administrar
juntos al mismo tiempo o en diferentes tiempos (por ejemplo, si hay
sacáridos presentes en una vacuna, éstos se podrían administrar por
separado al mismo tiempo, o de una a dos semanas después de la
10 administración de una vacuna de proteína bacteriana para
coordinación óptima de las respuestas inmunes una con respecto a
la otra). En adición a una sola vía de administración, se pueden
emplear dos vías de administración diferentes. Por ejemplo, los
antígenos virales se pueden administrar ID (intradérmicamente),
15 mientras que las proteínas bacterianas se pueden administrar IM
(intramuscularmente) o IN (intranasalmente). Si hay sacáridos
presentes, se pueden administrar intramuscularmente (o
intradérmicamente), y las proteínas bacterianas se pueden
administrar intranasalmente (o intradérmicamente). En adición, las
20 vacunas de la invención se pueden administrar intramuscularmente
para las dosis de preparación, e intranasalmente para las dosis de
refuerzo.

La preparación de la vacuna en general se describe en Vaccine
Design ("The subunit and adjuvant approach" (editores: Powell M. F.
25 & Newman M. J.) (1995) Plenum Press, Nueva York). La

encapsulación dentro de liposomas es descrita por Fullerton, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,235,877.

Un aspecto adicional de la invención es un kit de vacuna para su administración concomitante o en secuencia, el cual comprende
5 dos composiciones inmunogénicas multivalentes para conferir protección en un hospedero contra la enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, y *Neisseria meningitidis*, y opcionalmente *Haemophilus influenzae*. Por ejemplo, el kit opcionalmente comprende un primer
10 recipiente que comprende uno o más de:

toxoiide de tétanos (TT),
toxoiide de difteria (DT), y
componentes de tosferina de células enteras o acelulares,
y un segundo recipiente que comprende:

15 una composición inmunogénica de la invención como se describe anteriormente (por ejemplo, aquéllas que comprenden las combinaciones de conjugados de sacáridos Men o HibMen).

Un aspecto adicional de la invención es un kit de vacuna para su administración concomitante o en secuencia, el cual comprende
20 dos composiciones inmunogénicas multivalentes para conferir protección en un hospedero contra las enfermedades causadas por *Streptococcus pneumoniae*, y *Neisseria meningitidis*, y opcionalmente *Haemophilus influenzae*. Por ejemplo, el kit comprende opcionalmente un primer recipiente que comprende:

25 uno o más conjugados de una proteína portadora, y un sacárido

capsular a partir de *Streptococcus pneumoniae* [en donde el sacárido capsular es opcionalmente a partir de un serotipo neumocócico seleccionado a partir del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F],

y un segundo recipiente que comprende:

una composición inmunogénica de la invención como se describe anteriormente (por ejemplo, aquéllas que comprenden las combinaciones de conjugados de sacáridos Men o HibMen).

10 Los ejemplos del conjugado de Hib y los conjugados de polisacáridos de *N. meningitidis* son como se describen anteriormente.

Típicamente, la vacuna de *Streptococcus pneumoniae* en el kit de vacuna de la presente invención (o en cualquiera de las composiciones inmunogénicas de la invención descritas anteriormente) comprenderá antígenos de sacáridos (opcionalmente conjugados), en donde los sacáridos se derivan a partir de cuando menos cuatro serotipos de neumococo seleccionados a partir del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Opcionalmente, los cuatro serotipos incluyen 6B, 14, 19F, y 23F. Opcionalmente, se incluyen cuando menos siete serotipos en la composición, por ejemplo aquéllos derivados a partir de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F. Opcionalmente se incluyen más de siete serotipos en la composición, por ejemplo cuando menos 10, 11,

12, 13, ó 14 serotipos. Por ejemplo, la composición en una modalidad incluye 10 u 11 sacáridos capsulares derivados a partir de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, y opcionalmente 3 (todos opcionalmente conjugados). En una

5 modalidad de la invención, se incluyen cuando menos 13 antígenos de sacáridos (opcionalmente conjugados), aunque la invención también contempla antígenos de sacáridos adicionales, por ejemplo, 23-valentes (tales como los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F).

10 Los sacáridos neumocócicos se conjugan independientemente con cualquier proteína portadora conocida, por ejemplo CRM197, toxoide de tétanos, toxoide de difteria, proteína D, o cualesquiera otras proteínas portadoras, como se menciona anteriormente.

Opcionalmente, los kits de vacunas de la invención comprenden

15 un tercer componente. Por ejemplo, el kit comprende opcionalmente un primer recipiente que comprende uno o más de:

toxoide de tétanos (TT),

toxoide de difteria (DT), y

componentes de tosferina de células enteras o acelulares,

20 y un segundo recipiente que comprende:

uno o más conjugados de una proteína portadora y un sacárido capsular a partir de *Streptococcus pneumoniae* [en donde el sacárido capsular es opcionalmente a partir de un serotipo neumocócico seleccionado a partir del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B,

25 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F,

23F y 33F],

y un tercer recipiente, el cual comprende:

una composición inmunogénica de la invención, como se describe anteriormente (por ejemplo aquéllas que comprenden las combinaciones de conjugados de sacáridos Men o HibMen).

Un aspecto adicional de la invención es un proceso para la fabricación de la composición inmunogénica o vacuna de la invención, el cual comprende el paso de mezclar los sacáridos de la invención, por ejemplo mezclar los sacáridos capsulares de *N. meningitidis*, a partir de cuando menos uno, dos, tres, o los cuatro serogrupos A, C, W, e Y, conjugados con una proteína portadora, con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional de la invención es un método para inmunizar a un hospedero humano contra una enfermedad causada por bacterias, por ejemplo *N. meningitidis*, y opcionalmente infección por *Haemophylus influenzae*, el cual comprende administrar al hospedero una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención, opcionalmente utilizando una sola dosis.

Un aspecto independiente de la invención es un método para inmunizar a un hospedero humano con una composición inmunogénica que comprende cuando menos dos conjugados de sacáridos capsulares de *N. meningitidis* diferentes seleccionados a partir del grupo que consiste en los serogrupos A, C, W e Y (opcionalmente MenA, C, W, e Y), en donde la administración de una

sola dosis (opcionalmente a adolescentes, adultos, o niños) da como resultado una prueba de sangre tomada un mes después de la administración que da más del 50 por ciento, del 60 por ciento, del 70 por ciento, del 80 por ciento, del 90 por ciento, o del 95 por ciento de respondentes en un ensayo de SBA que mida los niveles de respuesta contra MenA, MenC, MenW, y/o MenY. Opcionalmente, el ensayo de SBA es como se describe en el Ejemplo 9, con el respondente evaluado como se describe en el Ejemplo 9.

Un aspecto independiente adicional de la invención es una composición inmunogénica que comprende los conjugados de MenA, MenC, MenW, y/o MenY, la cual es capaz de provocar una respuesta inmune después de una sola dosis, de tal manera que más del 50 por ciento, del 60 por ciento, del 70 por ciento, del 80 por ciento, del 90 por ciento, o del 95 por ciento de los sujetos humanos (niños, adolescentes, o adultos) inoculados, se clasifican como respondentes en un ensayo de SBA sobre sangre extraída un mes después de la inoculación (opcionalmente empleando los criterios descritos en el Ejemplo 9).

Esta composición inmunogénica opcionalmente tiene las características estructurales adicionales descritas en la presente.

Un aspecto adicional de la invención es una composición inmunogénica de la invención para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de una enfermedad causada por bacterias, por ejemplo *N. meningitidis*, y opcionalmente una infección por *Haemophilus influenzae*.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de la composición inmunogénica o vacuna o kit de la invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de las enfermedades causadas por bacterias, por ejemplo *N. meningitidis*, y opcionalmente infección por *Haemophilus influenzae*.

Los términos "comprendiendo", "comprenden", y "comprende", son pretendidos en la presente por los inventores como opcionalmente sustituibles con los términos "consistiendo en", "que consisten en", y "que consiste en", respectivamente, en cada caso.

Todas las referencias o solicitudes de patente citadas dentro de esta memoria descriptiva de patente se incorporan a la presente como referencia.

La invención se ilustra en los ejemplos acompañantes. Los siguientes Ejemplos se llevan a cabo empleando técnicas convencionales, las cuales son bien conocidas y de rutina para los expertos en la materia, excepto en donde se describa de otra manera con detalle. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de conjugados de polisacáridos

Se llevó a cabo el enlace covalente del polisacárido PRP de *Haemophilus influenzae* (Hib) con TT mediante la química de acoplamiento desarrollada por Chu y colaboradores (Infection and Immunity 1983, 40 (1); 245-256). El polisacárido PRP de Hib se activó mediante la adición de CNBr, e incubando a un pH de 10.5

durante 6 minutos. El pH se redujo hasta un pH de 8.75, y se agregó dihidrazida de ácido adípico (ADH), y se continuó la incubación durante 90 minutos adicionales. El PRP activado se acopló con toxoide de tétanos purificado por medio de condensación de carbodimida, utilizando 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-carbodimida (EDAC). La EDAC se agregó al PRP activado para alcanzar una proporción final de 0.6 miligramos de EDAC/miligramo de PRP activado. El pH se ajustó a 5.0, y se agregó el toxoide de tétanos purificado para alcanzar 2 miligramos de TT/miligramo de PRP activado. La solución resultante se dejó durante 3 días con agitación leve. Después de la filtración a través de una membrana de 0.45 micras, el conjugado se purificó en una columna Sephacryl S500HR (Pharmacia, Suecia) equilibrada en NaCl 0.2M.

Se produjeron conjugados de MenC-TT utilizando polisacáridos nativos (de más de 150 kDa, medidos mediante MALLS), o se microfluidizaron ligeramente. Se produjeron conjugados de MenA-TT utilizando polisacáridos nativos, o bien el polisacárido ligeramente microfluidizado de más de 60 kDa, medidos mediante el método MALLS del Ejemplo 2. Se produjeron los conjugados MenW y MenY-TT utilizando polisacáridos dimensionados de alrededor de 100 a 200 kDa, medidos mediante MALLS (ver el Ejemplo 2). El dimensionamiento se hizo mediante microfluidización utilizando un aparato homogeneizador Emulsiflex C-50. Entonces los polisacáridos se filtraron a través de un filtro de 0.2 micras.

La activación y el acoplamiento se llevaron a cabo como se

describe en las Publicaciones Internacionales Números WO96/29094 y WO 00/56360. Dicho de una manera breve, el polisacárido en una concentración de 10 a 20 miligramos/mililitro en NaCl 2M, pH de 5.5 a 6.0, se mezcló con la solución de CDAP (100 miligramos/mililitro recién preparada en acetonitrilo/WFI, 50/50), hasta una proporción final de CDAP/polisacárido de 0.75/1 ó de 1.5/1. Después de 1.5 minutos, el pH se elevó con hidróxido de sodio hasta un pH de 10.0. Después de 3 minutos, se agregó el toxoide de tétanos para alcanzar una proporción de la proteína/polisacárido de 1.5/1 para MenW, de 1.2/1 para MenY, de 1.5/1 para MenA, o de 1.5/1 para MenC. La reacción se continuó durante 1 a 2 horas.

Después del paso de acoplamiento, se agregó lisina hasta una proporción final de glicina/PS (peso/peso) de 7.5/1, y el pH se ajustó a un pH de 9.0. La mezcla se dejó durante 30 minutos. El conjugado se aclaró utilizando un filtro Kleenpak de 10 micras, y luego se cargó en una columna Sephacryl S400HR, utilizando un regulador de elución de NaCl 150 mM, Tris 10 mM ó 5 mM, pH de 7.5. Los lotes clínicos se filtraron sobre una membrana esterilizante Opticap 4. Los conjugados resultantes tuvieron una proporción promedio del polisacárido:proteína de 1:1-1:5 (peso/peso).

Ejemplo 1a - Preparación de conjugados de polisacáridos MenA y MenC de la invención

Se produjeron conjugados de MenC-TT utilizando polisacáridos nativos (de más de 150 kDa, medidos mediante MALLS), o se microfluidizaron ligeramente. Los conjugados de MenA-TT se

produjeron utilizando el polisacárido nativo, el polisacárido ligeramente microfluidizado de más de 60 kDa, medido mediante el método de MALLS del Ejemplo 2. El dimensionamiento se hizo mediante microfluidización, utilizando un aparato homogeneizador Emulsiflex C-50. Entonces los polisacáridos se filtraron a través de un filtro de 0.2 micras.

Con el objeto de conjugar el polisacárido capsular MenA con toxoide de tétanos por medio de un espaciador, se empleó el siguiente método. El enlace covalente del polisacárido y el espaciador (ADH) se lleva a cabo mediante una química de acoplamiento, mediante la cual se activa el polisacárido bajo condiciones controladas mediante un agente cianilante, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetil-amino-piridinio (CDAP). El espaciador reacciona con el PS cianilado a través de sus grupos hidrazino, para formar un enlace de isourea estable entre el espaciador y el polisacárido.

Una solución de 10 miligramos/mililitro de MenA (pH de 6.0) [3.5 gramos] se trató con una solución recién preparada de 100 miligramos/mililitro de CDAP en acetonitrilo/agua (50/50) (volumen/volumen)), para obtener una proporción de CDAP/MenA de 0.75 (peso/peso). Después de 1.5 minutos, el pH se elevó hasta un pH de 10.0. Tres minutos después, se agregó ADH para obtener una proporción de ADH/MenA de 8.9. El pH de la solución se disminuyó hasta 8.75, y la reacción procedió durante 2 horas, manteniendo este pH (con la temperatura mantenida a 25°C).

La solución de PSAAH se concentró hasta una cuarta parte de su volumen inicial, y luego se diafiltró con 30 volúmenes de NaCl 0.2M, utilizando una membrana Filtron Omega con un corte de 10 kDa, y se filtró el retentato.

5 Antes de la reacción de conjugación (condensación de carbodimida), la solución de TT purificada y la solución de PSAAH se diluyeron para alcanzar una concentración de 10 miligramos/mililitro para PSAAH, y de 10 miligramos/mililitro para TT.

10 Se agregó EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-carbodimida) a la solución de PSAAH (2 gramos de sacárido) con el objeto de alcanzar una proporción final de 0.9 miligramos de EDAC/miligramo de PSAAH. El pH se ajustó a 5.0. El toxoide de tétanos purificado se agregó con una bomba peristáltica (en 60 minutos) hasta alcanzar 2 miligramos de TT/miligramo de PSAAH. La solución resultante se
15 dejó durante 60 minutos a +25°C con agitación, para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 minutos. La solución se neutralizó mediante la adición de Tris-HCl 1M, pH de 7.5 (1/10 del volumen final), y se dejó durante 30 minutos a +25°C, y luego durante la noche de +2°C a +8°C.

20 El conjugado se aclaró utilizando un filtro de 10 micras, y se purificó utilizando una columna Sephacryl S400HR (Pharmacia, Suecia). La columna se equilibró en Tris-HCl 10 mM (pH de 7.0), NaCl 0.075 M, y se cargó el conjugado (aproximadamente 660 mililitros) sobre la columna (de +2°C a +8°C). La reserva de la
25 elución se seleccionó como una función de la densidad óptica a 280

nanómetros. La recolección empezó cuando la absorbencia se incrementó hasta 0.05. La cosecha continuó hasta que la kDa alcanzó 0.30. El conjugado se esterilizó por filtro a +20°C, luego se almacenó de +2°C a +8°C. El conjugado resultante tuvo una
5 proporción de polisacárido:proteína de 1:2 a 1:4 (peso/peso).

Con el objeto de conjugar el polisacárido capsular MenC con toxoide de tétanos por medio de un espaciador, se empleó el siguiente método. El enlace covalente del polisacárido y el espaciador (ADH) se lleva a cabo mediante una química de
10 acoplamiento, mediante la cual se activa el polisacárido bajo condiciones controladas, mediante un agente cianilante, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetil-amino-piridinio (CDAP). El espaciador reacciona con el PS cianilado a través de sus grupos hidrazino, para formar un enlace de isourea estable entre el
15 espaciador y el polisacárido.

Una solución de 20 miligramos/mililitro (pH de 6.0 (3.5 gramos) se trató con una solución recién preparada de 10 miligramos/mililitro de CDAP en acetonitrilo/agua (50/50) (volumen/volumen), para obtener una proporción de CDAP de 1.5 (peso/peso). Después de 1.5
20 minutos, el pH se elevó a un pH de 10.0. A la activación, se agregó NaCl 5M para alcanzar una concentración final de NaCl 2M. Tres minutos después, se agregó ADH para obtener una proporción de ADH/MenC de 8.9. El pH de la solución se disminuyó hasta 8.75, y la reacción procedió durante 2 horas (mantenida a 25°C).

25 La solución de PSAAH se concentró hasta un mínimo de 150

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

Antes de la reacción de conjugación, la solución purificada de
5 TT y la solución de PSAAH (escala de 2 gramos) se diluyeron en NaCl 0.2M para alcanzar una concentración de 15 miligramos/mililitro para PSCAH, y de 20 miligramos/mililitro para TT.

El toxoide de tétanos purificado se agregó a la solución de PSCAH con el objeto de alcanzar 2 miligramos de TT/miligramo de
10 PSCAH. El pH se ajustó a 5.0. Se agregó EDAC (16.7 miligramos/mililitro en Tris 0.1M, pH de 7.5) con una bomba peristáltica (en 10 minutos), para alcanzar una proporción final de 0.5 miligramos de EDAC/miligramo de PSCAH. La solución resultante se dejó durante 110 minutos a +25°C con agitación, y con regulación
15 del pH, para obtener un tiempo de acoplamiento final de 120 minutos. Luego la solución se neutralizó mediante la adición de Tris-HCl 1M, pH de 9.0 (1/10 del volumen final), y se dejó durante 30 minutos a +25°C, y luego durante la noche de +2°C a +8°C.

El conjugado se aclaró utilizando un filtro de 10 micras, y se
20 purificó utilizando una columna Sephacryl S400HR (Pharmacia, Suecia). La columna se equilibró en Tris-HCl 10 mM (pH de 7.0), NaCl 0.075M, y se cargó el conjugado (aproximadamente 460 mililitros) sobre la columna (de +2°C a +8°C). La reserva de la elución se seleccionó como una función de la densidad óptica a 280
25 nanómetros. La recolección se inició cuando la absorbencia aumentó

hasta 0.05. La cosecha se continuó hasta que la Kd alcanzó 0.20. El conjugado se esterilizó por filtro a +20°C, y luego se almacenó de +2°C a +8°C. El conjugado resultante tuvo una proporción de polisacárido:proteína de 1:2 a 1:4 (peso/peso).

5 Ejemplo 2 - Determinación del peso molecular utilizando MALLS

Los detectores se acoplaron a una columna de exclusión de tamaños de HPLC, de donde se eluyeron las muestras. Por una parte, el detector de dispersión de luz de láser midió las intensidades de luz dispersadas en 16 ángulos por la solución macromolecular, y por otra parte, un refractómetro interferométrico colocado en línea permitió hacer la determinación de la cantidad de muestra eluida. A partir de estas intensidades, se pueden determinar el tamaño y la forma de las macromoléculas en solución.

El peso molecular promedio en peso (M_w) se define como la suma de los pesos de todas las especies, multiplicada por su peso molecular respectivo, y dividida entre la suma de los pesos de todas las especies.

a) Peso molecular promedio en peso: - M_w -

$$20 \quad M_w = \frac{\sum W_i \cdot M_i}{\sum W_i} = \frac{m_2}{m_1}$$

b) Peso molecular promedio en número: - M_n -

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

c) Radio de raíz cuadrada promedio: - R_w - y R^2_w es el radio cuadrado definido por:

25

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

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

d) La polidispersidad se define como la proporción -Mw/Mn-.

Los polisacáridos meningocócicos se analizaron mediante MALLS cargándose sobre dos columnas de HPLC (TSKG6000 y 5000PWxl) utilizadas en combinación. Se cargaron 25 microlitros del polisacárido sobre la columna, y se eluyó con 0.75 mililitros de agua filtrada. Los polisacáridos se detectan utilizando un detector de dispersión de luz (Wyatt Dawn DSP equipado con un dispositivo de láser de argón de 10 mW a 488m nanómetros), y un refractómetro interferométrico (Waytt Otilab DSP, equipado con una celda P100, y un filtro rojo a 498 nanómetros).

El peso molecular, las polidispersidades, y las recuperaciones de todas las muestras, se calcularon mediante el método de Debye, utilizando un orden de ajuste polinómico de 1 en el software Astra 4.72.

Ejemplo 3 - Estudio clínico que compara la inmunización con Meningitec o un conjugado de MenC-TT de tamaño más grande

Se llevó a cabo un estudio controlado abierto en fase II para comparar la vacuna conjugada del serogrupo meningocócico C de GSK Biologicals (MenC), con la vacuna conjugada del serogrupo meningocócico C de *Haemophilus influenzae* b de GSK Biologicals

(Hib-MenC), o Meningitec®. Cada dosis de Meningitec® contiene 10 microgramos del oligosacárido del serogrupo meningocócico C conjugado con 15 microgramos de CRM197, y es producido por Wyeth. los conjugados MenC GSK contenían los polisacáridos
5 nativos de aproximadamente 200 kDa conjugados con el toxoide de tétanos (TT).

El estudio consistió en cinco grupos, cada uno planeado para contener 100 sujetos, asignados a dos conjuntos paralelos como sigue:

10 En el presente estudio, todos los sujetos de ambos conjuntos recibieron una quinta parte (1/5) de una dosis de Mencevax® ACWY, y una dosis concomitante de Infanrix® hexa a los 12-15 meses de edad (Mes de Estudio 0). Se recolectaron dos muestras de sangre de todos los sujetos (Mes de Estudio 0 y Mes de Estudio 1). El conjunto
15 1 consistió en cuatro grupos de un estudio de vacunación primaria que fueron vacunados a la edad de 3, 4, y 5 meses con las siguientes vacunas.

- Grupo K: MenC (10 microgramos), no adsorbido (no-ads), conjugado de toxoide de tétanos (TT) e Infanrix^{MR} hexa (MenC10-TT
20 + Infanrix^{MR} hexa).

- Grupo L: Hib (10microgramos)-MenC (10 microgramos), no adsorbido, conjugado de TT e Infanrix^{MR} penta (Hb10-MenC10-TT + Infanrix^{MR} penta).

- Grupo M: Hib (5 microgramos)-MenC (5 microgramos), no
25 adsorbido, conjugado de TT e infanrin^{MR} penta (Hib5-MenC5-TT +

Infanrix^{MR} penta).

- Grupo N: Meningitec^{MR} e Infanrix^{MR} hexa (Meningitec^{MR} + Infanrix^{MR} hexa).

Los dos grupos de vacunas de Hib-MenC-TT (Grupos L y M) se mantuvieron ciegos en el estudio de refuerzo con respecto a la formulación exacta de la vacuna candidata.

El conjunto 2 -(Grupo O) consistió en sujetos de edades emparejadas no vacunados previamente con una vacuna del serogrupo meningocócico C (limpios), pero que habían recibido vacunas pediátricas de rutina de acuerdo con la German Permanent Commission on Immunization (Comisión Permanente Alemana sobre Inmunización).

Criterios para la evaluación:

Inmunogenicidad: Determinación de las titulaciones de anticuerpos bactericidas contra el meningococo C (SBA-MenC) mediante una prueba bacteriana (corte: una dilución de 1:8), y medición ELISA de los anticuerpos contra el serogrupo meningocócico C (corte del ensayo: 0.3 microgramos/mililitro), el polisacárido PRP de Hib (corte del ensayo: 0.15 microgramos/mililitro), y el toxoide de tétanos (corte del ensayo: 0.1 Unidades Internacionales/mililitro), en muestras de sangre obtenidas antes de la vacunación y aproximadamente un mes después de la vacunación en todos los sujetos.

Métodos estadísticos:

Demografía: Determinación de la edad promedio en meses (con

promedio, intervalo, y desviación estándar [SD]), y composición racial y de género de las cohortes vacunadas con ATP y totales.

Inmunogenicidad:

Se llevaron a cabo dos análisis de inmunogenicidad basándose en la cohorte de ATP para la inmunogenicidad (para los análisis de la memoria inmune y la respuesta al refuerzo) o la cohorte de ATP para la seguridad (para el análisis de la persistencia). Éstos incluyeron:

Evaluación de la memoria inmune para MenC y la respuesta al refuerzo para Hib y tétanos (antes y un mes después de la administración de 1/5 de la dosis de la vacuna del polisacárido llano):

- Determinación de las titulaciones medias geométricas y de las concentraciones (GMTs y GMCs) con intervalos de confianza del 95 por ciento (95% CI).
- Determinación del porcentaje de sujetos con titulación/concentración de anticuerpos arriba de los cortes propuestos con un intervalo de confianza exacto del 95 por ciento (índices de seropositividad/seroprotección).
- Investigación de titulaciones/concentración de anticuerpos después de la vacunación utilizando curvas acumulativas inversas.
- Cálculo del intervalo de confianza del 95 por ciento asintótico estandarizado para la diferencia en el índice de seropositividad/seroprotección.
- Entre el grupo vacunado (grupos K, L, M, y N) y el grupo

no vacunado (grupo O).

- Determinación de la media geométrica de la proporción individual de la titulación de SBA-MenC sobre la concentración de anti-PSC, con un intervalo de confianza del 95 por ciento.
- 5 • Determinación del intervalo de confianza del 95 por ciento para la proporción de GMT/C después de la vacunación entre los grupos K, L, M, y el grupo de control N, para anti-PRP y anti-tétanos, y entre cada grupo vacunado (grupos K, L, M, y N), y el grupo no vacunado (grupo O) para SBA-MenC y anti-PSC utilizando un modelo
- 10 ANOVA.

Resultados

Tabla 1. Titulaciones de SBA-MenC y concentración de anticuerpo anti-PSC después de la vacunación de refuerzo.

	Anticuerpo	Grupo	N	GMT/C	95% CL LL	95% CL UL
15	SBA-MenC	K-MenC-TT	71	3508.9	2580.1	4772.2
		L-HibMenC	79	2530.1	1831.7	3494.7
		M-HibMenC	81	5385.4	4425.0	6554.2
		N-Meningitec	85	1552.6	1044.4	2307.9
		O-Control	91	9.3	6.3	13.6
20	Anti-PSC	K-MenC-TT	70	28.10	22.59	34.95
		L-HibMenC	71	30.01	24.09	37.38
		M-HibMenC	76	34.58	29.10	41.09
		N-Meningitec	78	16.59	12.98	21.21
25		O-Control	94	3.05	2.36	3.93

Grupo K: Sujetos vacunados con MenC-TT + Infanrix hexa;
Grupo L: Sujetos vacunados con Hib10-MenC10-TT + Infanrix, penta;
Grupo M: Sujetos vacunados con Hib5-MenC5-TT + Infanrix, penta;
Grupo N: Sujetos vacunados con Meningitec + Infanrix, hexa; Grupo
5 O: Sujetos de control (es decir, sujetos no vacunados con la vacuna
conjugada de MenC).

N: Número de sujetos con resultados disponibles.

Se lograron titulaciones más altas de anticuerpos contra MenC
y titulaciones más altas de SBA vacunando con las vacunas
10 conjugadas de polisacárido MenC de tamaño más grande (grupos K,
L, y M), comparándose con la vacuna conjugada de oligosacárido
Meningitec.

Tabla 2. Proporción media geométrica para titulación de MenC
15 **SBA/concentración de anti-PSC**

Grupo	Tiempo	N	GMR	LL	UL
K	Pre	70	49.470	34.939	70.044
	Post	66	126.138	101.419	156.882
L	Pre	76	36.528	25.849	51.621
	Post	70	90.200	70.153	115.975
M	Pre	77	51.298	36.478	72.139
	Post	74	164.950	139.304	195.318

5

Grupo	Tiempo	N	GMR	LL	UL
N	Pre	84	22.571	16.521	30.837
	Post	76	90.168	67.757	119.991
O	Pre	3	91.634	0.651	12889.8
	Post	87	2.708	1.767	4.149

10

En los cuatro grupos vacunados (grupos K, L, M, y N), GMR aumentó de una manera significativa desde antes hasta después de la vacunación de refuerzo, indicando la presencia de la maduración del anticuerpo y su funcionalidad. GMR en el grupo M (vacunado con Hib5-MenC5-TT) fue más alta que en el grupo N (vacunado con Meningitec^{MR}).

15

Tabla 3. Persistencia a los 12-15 meses de edad, justo antes de la administración de las vacunas de refuerzo

20

25

Puntos finales	Grupo	N	%	Grupo	N	%	Diferencia	Valor %
SBAMenC ≥ 1:8	K	79	88.6	N	91	80.2	N-K	-8.4
	L	84	93.3	N	91	80.2	N-L	-3.1
	M	85	87.1	N	91	80.2	N-M	-6.8
SBAMenC ≥ 1:128	K	79	65.8	N	91	51.6	N-K	-14.2
	L	84	56.0	N	91	51.6	N-L	-4.3

5

10

15

20

Puntos finales	Grupo	N	%	Grupo	N	%	Diferencia	Valor %
	M	85	64.7	N	91	51.6	N-M	-13.1
Anti-PSC ≥0.3µg/ml	K	79	100.0	N	91	100.0	N-K	0.0
	L	84	100.0	N	91	100.0	N-L	0.0
	M	88	98.9	N	91	100.0	N-M	1.1
Anti-PSC ≥2µg/ml	K	79	72.2	N	91	81.3	N-K	9.2
	L	84	64.3	N	91	81.3	N-L	17.0
	M	88	64.3	N	91	81.3	N-M	8.5
Anti-PRP ≥0.15µg/ml	K	81	88.9	N	91	85.7	N-K	-3.2
	L	86	96.5	N	91	85.7	N-L	-10.8
	M	90	98.9	N	91	85.7	N-M	-13.2
Anti-PRP ≥1µg/ml	K	81	33.3	N	91	28.6	N-K	-4.8
	L	88	55.8	N	91	28.6	N-L	-27.2
	M	90	74.4	N	91	28.6	N-M	-45.9
Anti-tétanos ≥0.1 IU/ml	K	81	100.0	N	91	96.7	N-K	-3.3
	L	86	100.0	N	91	96.7	N-L	-3.3
	M	90	100.0	N	91	96.7	N-M	-3.3

25

Grupo K: Sujetos vacunados con MenC10-TT + Infanrix^{MR} hexa;
Grupo L: sujetos vacunados con Hib10-MenC-TT + Infanrix^{MR} penta;
Grupo M: Sujetos vacunados con Hib5-MenC5-TT + Infanrix^{MR} penta;
Grupo N: Sujetos vacunados con Meningitec^{MR}+ Infanrix^{MR} hexa; N:

Número de sujetos con resultados disponibles.

Se lograron titulaciones más altas de SBA contra MenC al vacunar con el tamaño más grande de MenC (grupos K, L, M, y N) comparándose con la vacunación con el conjugado de oligosacárido MenC Meningitec^{MR}.

Memoria inmune (cohorte de ATP para la inmunogenicidad).

La administración de 1/5 de la dosis de la vacuna del polisacárido llano ACWY provocó una titulación muy alta de SBA-MenC en los cuatro grupos vacunados, exhibiendo del 98.7 al 100 por ciento y del 97.5 al 100 por ciento de los sujetos vacunados con el régimen de vacunación candidato titulaciones $\geq 1:8$ y $\geq 1:128$, respectivamente. En el grupo vacunado con el régimen de Meningitec^{MR}, hubo una tendencia a un porcentaje más bajo de sujetos con titulaciones $\geq 1:128$ (91.8 por ciento). En comparación, el 17.6 por ciento de los sujetos no vacunados tuvieron titulaciones de SBA MenC $\geq 1:8$ y $\geq 1:128$.

Ejemplo 4 - Estudio clínico en fase II sobre la vacuna de conjugado de HibMenAC-TT mezclada con DTTw-HepB

Diseño del estudio: estudio de un solo centro, abierto, de selección aleatoria (1:1:1:1:1) con cinco grupos. Los cinco grupos recibieron el siguiente régimen de vacunación, respectivamente, a las 6, 10, y 14 semanas de edad.

- Tritanrix^{MR}-HepB/Hib-MenAC 2.5/2.5/2.5: y por consiguiente, referido como 2.5/2.5/2.5.
- Tritanrix^{MR}-HepB/Hib-MenAC 2.5/5/5: y por consiguiente,

referido como 2.5/5/5.

- Tritanrix^{MR}-HepB/Hib-MenAC 5/5/5: y por consiguiente, referido como 5/5/5.
- Tritanrix^{MR}-HepB + Hiberix^{MR}: y por consiguiente, referido como Hiberix.
- Tritanrix^{MR}-HepB/Hiberix^{MR} + Meningitec^{MR}: y por consiguiente, referido como Meningitec.

Se tomaron muestras de sangre en el momento de la primera dosis de vacuna (Pre), y un mes después de la tercera dosis de vacuna (posterior a la dosis 3).

Tritanrix es una vacuna de DTPw comerciada por GlaxoSmithKline Biologicals S.A.

Se utilizaron 105 sujetos en cada uno de los cinco grupos, dando un total de 525 sujetos en el estudio.

Tabla 4. Contenido de Formulaciones de Vacuna de GSK

Componentes por dosis (0.5 mililitros)	2.5/2.5/2.5*	2.5/5/5	5/5/5
Polisacárido capsular PRP de Hib conjugado con toxoide de tétanos (TT).	2.5 µg	2.5 µg	5 µg
Polisacárido capsular de <i>Neisseria meningitidis</i> A (PSA) conjugado con TT.	2.5 µg	5 µg	5 µg

5

Componentes por dosis (0.5 mililitros)	2.5/2.5/2.5*	2.5/5/5	5/5/5
Polisacárido capsular de <i>Neisseria meningitidis</i> C (PSC) conjugado con TT.	2.5 µg	5 µg	5 µg

10

*La vacuna 2.5/2.5/2.5 fue una dilución de la dosis de la vacuna Hib-MenAC 5/5/5 de GSK Biologicals conteniendo 2.5 microgramos de cada uno de PRP-TT, MenA-TT, y MenC-TT.

15

Las formulaciones de vacuna de Hib-MenAC se mezclaron extemporáneamente con Tritanrix-HepB. La vacuna combinada de *Bordetella Pertussis* de células enteras de difteria-tétanos - hepatitis B (DTPw-HB) (Tritanrix-HepB) contiene no menos de 30 Unidades Internacionales (IU) de toxoide de difteria, no menos de 60 Unidades Internacionales de toxoide de tétanos, no menos de 4 Unidades Internacionales *Bordetella pertussis* muertas, y 10 microgramos de antígeno superficial de hepatitis B recombinante.

20

Terapia de referencia, dosis, modo de administración, número de lote:

25

Programa/sitio de vacunación: Un grupo recibió la vacuna Tritanrix-HepB intramuscularmente en el muslo izquierdo, y Hiberix intramuscularmente en el muslo derecho a las 6, 10, y 14 semanas de edad. Otro grupo recibió la vacuna Tritanrix^{MR}-HepB/Hiberix^{MR} intramuscularmente en el muslo izquierdo, y la vacuna Meningitec^{MR} intramuscularmente en el muslo derecho a las 6, 10, y 14 semanas

de edad.

Vacuna/composición/dosis/número de lote: La vacuna Tritanrix^{MR}-HepB utilizada fue como se describe anteriormente.

Una dosis (0.5 mililitros) de vacuna conjugada de *Haemophilus influenzae* tipo b de GSK Biologicals: Hiberix^{MR} contuvo 10 microgramos de PRP conjugado con toxoide de tétanos. En el grupo de Hiberix^{MR}, se mezcló con diluyente estéril, y en el grupo de Meningitec^{MR} se mezcló con Tritanrix^{MR}-HepB.

Una dosis (0.5 mililitros) de vacuna MENINGITEC^{MR} de Wyeth Lederle contuvo: 10 microgramos de polisacárido capsular del grupo meningocócico C conjugado con 15 microgramos de proteína CRM197 de *Corynebacterium diphtheria*, y aluminio como sales.

Resultados - Respuestas inmunes generadas contra Hib, MenA, y MenC

Tabla 5a. Anti-PRP (microgramos/mililitro)

Grupo	2.5/2.5/2.5			2.5/5/5			5/5/5			Hiberix ^{MR}			Meningitec ^{MR}		
	%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL	
	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL
%≥0.15	100	96.5	100	99.0	94.8	100	100	96.5	100	100	96.5	100	100	96.5	100
GMC	20.80	15.96	27.10	22.62	17.72	28.88	19.36	15.33	24.46	38.55	29.93	49.64	10.94	8.62	13.88

Tabla 5b. SBA-MenC

Grupo	2.5/2.5/2.5	2.5/5/5	5/5/5	Hiberix ^{MR}	Meningitec ^{MR}
	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL
%≥1:8	99 94.7 100	100 96.5 100	100 96.5 100	2.9 0.6 8.4	100 96.5 100
GMT	3132 2497 3930	4206 3409 5189	3697 3118 4384	4.7 3.9 5.6	4501 3904 5180

Tabla 5c. SBA-MenA

Grupo	2.5/2.5/2.5	2.5/5/5	5/5/5	Hiberix ^{MR}	Meningitec ^{MR}
	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL
%≥1:8	99.7 91.9 99.7	100 95.8 100	100 96.2 100	6.8 2.5 14.3	9.1 4.0 17.1
GMT	316.7 251.4 398.9	418.5 358.6 488.5	363 310.5 424.4	5.6 4.3 7.4	5.6 4.4 7.2

Tabla 5d. Anti-PSC (microgramos/mililitro)

Grupo	2.5/2.5/2.5	2.5/5/5	5/5/5	Hiberix ^{MR}	Meningitec ^{MR}
	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL
%≥0.3	100 96.5 100	100 96.4 100	100 96.5 100	8.2 3.6 15.6	100 96.5 100
GMC	49.03 43.24 55.59	71.11 62.49 80.92	61.62 54.88 69.20	0.17 0.15 0.19	58.02 51.42 65.46

Tabla 5e. Anti-PSA (microgramos/mililitro)

Grupo	2.5/2.5/2.5			2.5/5/5			5/5/5			Hiberix ^{MR}			Meningitec ^{MR}		
	%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL	
	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL
%≥0.3	100	96.4	100	100	96.5	100	99.0	94.8	100	1.0	0.0	5.4	5.9	2.2	12.5
GMC	18.10	15.34	21.35	26.51	22.93	30.79	23.40	20.05	27.30	0.15	0.15	0.15	0.17	0.15	0.18

Conclusión

Una comparación de los resultados de inmunogenicidad logrados utilizando la vacuna conjugada de oligosacárido MenC-CRM197 y las tres formulaciones de GSK que contienen los conjugados de polisacáridos MenA-TT y MenC-TT mostró que los conjugados del polisacárido Men fueron capaces de provocar una buena respuesta inmunogénica, similar a la lograda utilizando la vacuna conjugada de oligosacárido Meningitec. Todas las formulaciones probadas dieron una respuesta a MenC en el 100 por ciento de los pacientes.

Ejemplo 5 - Estudio clínico en fase II administrando HibMenCY de una manera concomitante con Infanrix penta de acuerdo con un programa de 2, 3, y 4 meses

Diseño del estudio: Un estudio de múltiples centros controlado, en fase II, abierto (parcialmente doble-ciego*), de selección aleatoria, con cinco grupos recibiendo un programa primario de tres dosis con vacunas como sigue:

Grupo Hib-MenCY 2.5/5/5: Hib-MenCY (2.5/5/5) + Infanrix^{MR} penta.

Grupo Hib-MenCY 5/10/10: Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix^{MR} penta.

Grupo Hib-MenCY 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix^{MR} penta.

Grupo Hib-MenC: Hib-MenC (5/5) + Infanrix^{MR} penta.

Grupo Menjugate: Menjugate^{MR**} + Infanrix^{MR} hexa (control).

5 *Hib-MenCY 2.5/5/5, Hib-MenCY 5/10/10 y Hib-MenC se
administraron de una manera doble-ciega, mientras que el grupo
HibMenCY 5/5/5 y el grupo de Menjugate fueron abiertos. Las
formulaciones de 2.5/5/5, 5/10/10 y 5/5/5 de Hib-MenCY contienen
polisacáridos nativos MenC y polisacáridos MenY que se
10 microfluidizan.

 **Menjugate^{MR} contiene 10 microgramos de los oligosacáridos
MenC conjugados con 12.5 a 25 microgramos de CRM197 por dosis,
y es producido por Chiron.

 Vacunación a los +/- 2, 3, 4 meses de edad (mes del estudio 0,
15 mes 1, y mes 2), y las muestras de sangre (3.5 mililitros) de todos
los sujetos antes de, y un mes de, la vacunación primaria (mes del
estudio 0, y mes 3).

**Vacuna de estudio, dosis, modo de administración, número
de lote:** Tres dosis inyectadas intramuscularmente a intervalos de un
20 mes, a aproximadamente los 2, 3, y 4 meses de edad, como sigue:

Tabla 6. Vacunas administradas (estudio y control), grupo, programa/sitio, y dosis

5		Grupo	Programa (meses de edad)	Dosis de vacuna administrada Sitio-muslo superior izquierdo	Vacuna concomitante administrada Sitio-muslo superior derecho
		Hib-MenCY 2.5/5/5	2, 3, y 4	Hib (2.5µg)- MenC-TT (5µg)-MenY-TT (5 µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix ^{MR} penta)
10		Hib-MenCY 5/10/10	2, 3, y 4	Hib (5µg)-MenC-TT (10µg)-MenY-TT (10µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix ^{MR} penta)
		Hib-MenCY 5/5/5	2, 3, y 4	Hib (5µg)-MenC-TT (5µg)-MenY-TT (5µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix ^{MR} penta)
15		Hib-MenC	2, 3, y 4	Hib (5µg)-Men C (5µg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix ^{MR} penta)
		Menjugate ^{MR}	2, 3, y 4	Menjugate ^{MR}	DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix ^{MR} hexa)

Inmunogenicidad: Medición de titulaciones/concentraciones de anticuerpos contra cada antígeno de vacuna:

Antes de la primera dosis (mes 0), y aproximadamente un mes después de la tercera dosis (mes 3) en todos los sujetos para: SBA-MenC y SBA-MenY, anti-PSC y anti-PSY, anti-PRP, anti-T, anti-FHA, anti-PRN y anti-PT. Utilizando la actividad bactericida en suero contra los serogrupos C e Y de *N. meningitidis* (SBA-MenC y SBA-

MenY, corte: 1:8 y 1:128); ensayos ELISA con cortes: ≥ 0.3 microgramos/mililitro y ≥ 2 microgramos/mililitro para los polisacáridos anti-*N. meningitidis* serogrupos C e Y (anti-PSC IgG y anti-PSY IgG); ≥ 0.15 microgramos/mililitro y ≥ 1.0 microgramos/mililitro para el polisacárido de poli-ribosil-ribitol-fosfato de Hib (anti-PRP IgG); 5EL.U/mililitro para anti-FHA, anti-PRN, anti-PT; ≥ 0.1 Unidades Internacionales/mililitro de anti-toxoide de tétanos (anti-TT). Solamente un mes después de la tercera dosis (mes 3) en todos los sujetos para: anti-D, anti-HBs, y anti-polio 1, 2, y 3.

Utilizando ensayos ELISA con cortes: 0.1 Unidades Internacionales/mililitro para anti-difteria (anti-D); ≥ 10 miliunidades internacionales/mililitro para anti-hepatitis B (anti-HBs); y corte de prueba de microneutralización: 1:8 para anti-polio tipo 1, 2, y 3 (anti-polio 1, 2, y 3).

15 **Métodos estadísticos:**

Se calcularon los índices de seroprotección/seropositividad y las concentraciones/titulaciones medias geométricas (GMCs/GMTs) con intervalos de confianza del 95 por ciento (95% CI) por grupo, para SBAS-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY, anti-PRP, anti-Tétanos, anti-PT, anti-FHA, y anti-PRN, antes de, y un mes después de, la vacunación; para anti-difteria, anti-HBs, anti-Polio 1, anti-Polio 2, y anti-Polio 3 un mes después de la vacunación. También se calculó la respuesta de la vacuna (aparición de anticuerpos en sujetos inicialmente seronegativos, o cuando menos mantenimiento de las concentraciones de anticuerpos en los sujetos inicialmente

seropositivos) con un intervalo de confianza del 95 por ciento para anti-PT, anti-PRN, y anti-FHA, un mes después de la vacunación. También se presentan las curvas acumulativas inversas para cada anticuerpo en el mes 3. Se evaluaron las diferencias entre los grupos de HibMenCY y HibMenC, comparándose con el grupo de control de Menjugate^{MR}, de una manera exploratoria para cada anticuerpo, con la excepción de SBAMenY y anti-PSY, en términos de: (1) la diferencia entre el grupo de Menjugate^{MR} (menos) los grupos de HibMenCY y HibMenC, para el porcentaje de sujetos arriba de los cortes especificados, o con una respuesta de vacuna con su intervalo de confianza del 95 por ciento asintótico estandarizado, (2) las proporciones de GMC ó GMT del grupo de Menjugate^{MR} sobre los grupos de HibMenCY y HibMenC con su intervalo de confianza del 95 por ciento. Se hicieron las mismas comparaciones para evaluar la diferencia entre cada par de formulaciones de Hib-MenCY para los anticuerpos anti-PRP, SBA-MenC, anti-PSC, SBA-MenY, anti-PSY, y anti-TT.

Se calcularon las incidencias globales de los síntomas locales y generales solicitados por grupo de acuerdo con el tipo de síntoma, su intensidad, y su relación con la vacunación (como porcentajes de los sujetos que reportaron síntomas generales, locales, y cualesquiera síntomas solicitados dentro de los 8 días en seguida de la vacunación, y su intervalo de confianza del 95 por ciento exacto). Se calcularon las incidencias de síntomas no solicitados por grupo. Para los síntomas de Grado 3, se proporcionaron establecimiento

≤48 horas, atención médica, duración, relación con la vacunación, y resultados. Se describieron completamente los Eventos Adversos Severos.

Índices de seroprotección/seropositividad y GMC/Ts (cohorte de ATP para la inmunogenicidad).

Tabla 7a. Anti-PRP (microgramos/mililitro)

Grupo	N	%≥0.15	LL	UL	≥1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	67	100.0	94.6	100.0	98.5	92.0	100.0	9.01	7.25	11.21
Hib MenCY 5/10/10	67	100.0	94.6	100.0	98.5	92.0	100.0	9.49	7.72	11.65
Hib MenCY 5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	98.6	92.3	100.0	8.08	6.53	9.98
Hib MenC	74	100.0	95.1	100.0	98.6	92.7	100.0	10.44	8.49	12.83
Menjugate ^{MR}	71	100.0	94.9	100.0	80.3	69.1	88.8	2.60	1.97	3.43

Tabla 7b. SBA-MenC (Titulación)

Grupo	N	%≥1:8	LL	UL	≥1:128	LL	UL	GMT	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	95.7	88.0	99.1	1005.8	773.5	1308.0
Hib MenCY 5/10/10	67	100.0	94.6	100.0	94.0	85.4	98.3	1029.8	799.7	1326.0
Hib MenCY 5/5/5	71	100.0	94.9	100.0	94.4	86.2	98.4	906.9	691.3	1189.8
Hib MenC	74	100.0	95.1	100.0	95.9	88.6	99.2	871.0	677.3	1120.0
Menjugate ^{MR}	71	100.0	94.9	100.0	100.0	94.9	100.0	3557.6	2978.8	4248.8

Tabla 7c. Anti-PSC (microgramos/mililitro)

Grupo	N	%≥0.3	LL	UL	≥2	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	69	100.0	94.8	100.0	100.0	94.8	100.0	21.70	18.36	25.65
Hib MenCY 5/10/10	66	100.0	94.6	100.0	100.0	94.6	100.0	27.26	23.26	31.95
Hib MenCY 5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	100.0	94.9	100.0	19.02	16.49	21.93
Hib MenC	74	100.0	95.1	100.0	100.0	95.1	100.0	21.08	18.24	24.35
Menjugate ^{MR}	71	100.0	94.9	100.0	100.0	94.9	100.0	38.49	33.64	44.05

Tabla 7d. SBA-MenY (Titulación)

Grupo	N	%≥1:8	LL	UL	≥1:128	LL	UL	GMT	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	69	97.1	89.9	99.6	92.8	83.9	97.6	470.7	351.1	631.2
Hib MenCY 5/10/10	66	97.0	89.5	99.6	86.4	75.7	93.6	437.1	322.0	593.4.8
Hib MenCY 5/5/5	71	98.6	92.4	100.0	95.8	88.1	99.1	635.3	501.5	804.8
Hib MenC	74	21.6	12.9	32.7	13.5	6.7	23.5	9.3	6.3	13.7
Menjugate ^{MR}	71	19.7	11.2	30.9	9.9	4.1	19.3	7.5	5.4	10.4

Tabla 7e. Anti-PSY (microgramos/mililitro)

Grupo	N	%≥0.3	LL	UL	≥2	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	69	100.0	94.8	100.0	100.0	94.8	100.0	26.86	22.86	31.56
Hib MenCY 5/10/10	66	100.0	94.6	100.0	100.0	94.6	100.0	37.02	31.84	43.04
Hib MenCY 5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	100.0	94.9	100.0	23.57	19.94	27.86
Hib MenC	74	8.1	3.0	16.8	4.1	0.8	11.4	0.19	0.15	0.25

Menjugate ^{MR}	71	5.6	1.6	13.8	1.4	0.0	7.6	0.17	0.15	0.19
-------------------------	----	-----	-----	------	-----	-----	-----	------	------	------

Tabla 7f. Anti-tétanos (IU/ml)

5		Grupo	N	%≥0.1	LL	UL	GMC	LL	UL
		Hib MenCY 2.5/5/5	68	100.0	94.7	100.0	3.06	2.63	3.55
		Hib MenCY 5/10/10	67	100.0	94.6	100.0	3.25	2.88	3.68
		Hib MenCY 5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	2.97	2.59	3.41
10		Hib MenC	74	100.0	95.1	100.0	3.15	2.73	3.64
		Menjugate ^{MR}	71	100.0	94.9	100.0	1.66	1.39	1.97

Grupo Hib-MenCY 2.5/5/5: Hib-MenCY (2.5/5/5) + Infanrix^{MR} penta.

Grupo Hib-MenCY 5/10/10: Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix^{MR} penta.

15 **Grupo Hib-MenCY 5/5/5:** Hib-MenCY (5/5/5) +Infanrix^{MR} penta.

Grupo Hib-MenC: Hib-Men (5/5)+ Infanrix^{MR} hexa.

Grupo Menjugate: Menjugate^{MR} + Infanrix^{MR} penta.

N = Número de sujetos con resultados disponibles. % = porcentaje de sujetos con concentración/titulación dentro del intervalo especificado.

20 GMC/T: Concentración/titulación media geométrica; 95% CI = intervalo de confianza del 95 por ciento; LL = límite inferior; UL = límite superior.

Conclusión

25 Los conjugados de polisacáridos MenC e Y produjeron una

buena respuesta inmune en todos los sujetos, produciendo el 100 por ciento de los sujetos respuestas de más de 0.3 microgramos/mililitro contra MenC y MenY.

Ejemplo 6 - Estudio clínico en fase II que compara tres

5 **formulaciones de MenACWY-TT con la vacuna conjugada del oligosacárido MenC-CRM197 Meningitec**

Este ejemplo reporta un estudio controlado de intervalo de dosis, en fase II, abierto (parcialmente ciego), de selección aleatoria, para evaluar la inmunogenicidad de tres formulaciones diferentes de los serogrupos meningocócicos A, C, W-135, Y, vacuna conjugada de toxoide de tétanos (MenACWY-TT), de GlaxoSmithKline Biologicals, en comparación con una vacuna conjugada de oligosacárido MenC-CRM197 (Meningitec^{MR}), cuando se da como una dosis a niños de 12 a 14 meses de edad.

15 El estudio clínico fue un estudio de múltiples centros, controlado, abierto (parcialmente doble-ciego*), en donde los sujetos elegibles de 12 a 14 meses de edad se seleccionaron aleatoriamente (1:1:1:1) para uno de cuatro grupos paralelos de 50 sujetos, para recibir una sola dosis primaria en la Cita 1 como sigue:

20 Forma 1T: MenACWY-TT en una dosis de 2.5 microgramos del polisacárido MenA conjugado con el toxoide de tétanos (TT), 2.5 microgramos del polisacárido MenC conjugado con el toxoide de tétanos, 2.5 microgramos del polisacárido MenW conjugado con el toxoide de tétanos, y 2.5 microgramos del polisacárido MenY
25 conjugado con el toxoide de tétanos.

Forma 2T: MenACWY-TT en una dosis de 5 microgramos del polisacárido MenA conjugado con el toxoide de tétanos, 5 microgramos del polisacárido MenC conjugado con el toxoide de tétanos, 5 microgramos del polisacárido MenW conjugado con el toxoide de tétanos, y 5 microgramos del polisacárido MenY conjugado con el toxoide de tétanos.

Forma 3T: MenACWY-TT en una dosis de 2.5 microgramos del polisacárido MenA conjugado con el toxoide de tétanos, 10 microgramos del polisacárido MenC conjugado con el toxoide de tétanos, 2.5 microgramos del polisacárido MenW conjugado con el toxoide de tétanos, y 2.5 microgramos del polisacárido MenY conjugado con el toxoide de tétanos.

Ctrl T: 10 microgramos del oligosacárido MenC conjugado con 12.5 a 25 microgramos de CRM197 (Meningitec).

*Las tres diferentes formulaciones de MenACWY-TT se administraron de una manera doble-ciega.

Programa/sitio de vacunación: Se administró una sola dosis de vacuna intramuscularmente en el deltoide izquierdo en la Cita 1 (Mes de Estudio 0) de acuerdo con la asignación aleatoria. Todas las vacunas candidatas fueron suministradas como un gránulo liofilizado en un frasco de una sola dosis (0.5 mililitros después de la reconstitución con el diluyente de suero suministrado).

Inmunogenicidad: Medición de las titulaciones/ concentraciones de anticuerpos contra los componentes del antígeno de la vacuna meningocócica en las muestras de sangre obtenidas

antes de la dosis de la vacuna en estudio (mes 0), y
aproximadamente 1 mes después de la dosis de la vacuna en estudio
(mes 1) en todos los sujetos. Determinación de las titulaciones de
anticuerpos bactericidas contra *N. meningitidis* serogrupos A, C, W-
5 135, e Y (SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW, y SBA-MenY)
mediante una prueba bactericida (cortes de ensayo: una dilución de
1:8 y 1:128), y medición ELISA de los anticuerpos contra *N.*
meningitidis serogrupos A, C, W-135, e Y (anti-PSA, anti-PSC, anti-
PSW, y anti-PSY, cortes de ensayo ≥ 0.3 microgramos/mililitro y ≥ 2
10 microgramos/mililitro), y toxoide de tétanos (anti-tétanos, corte de
ensayo de 0.1 Unidades Internacionales/mililitro).

Resultados

Respuesta de anticuerpos en términos del porcentaje de
respondentes a SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW, y SBA-MenY, un
15 mes después de la vacunación (el punto final primario), como se
muestra en la Tabla 8. Una respuesta se define como mayor que, o
igual a, un aumento de cuatro veces para los sujetos seropositivos, o
seroconversión para los sujetos seronegativos antes de la
vacunación.

20

25

Tabla 8. Respuestas a la vacuna para el anticuerpo SBA un mes después de la vacunación

	Anticuerpo	Grupo	N	%	LL	UL
5	SBA-MenA	Forma 1T	42	61.9	45.6	76.4
		Forma 2T	39	82.1	66.5	92.5
		Forma 3T	40	62.5	45.8	77.3
		Meningitec ^{MR}	36	11.1	3.1	26.1
10	SBA-MenC	Forma 1T	46	97.8	88.5	99.9
		Forma 2T	43	100.0	91.8	100.0
		Forma 3T	44	95.5	84.5	99.4
		Meningitec ^{MR}	49	91.8	80.4	97.7
15	SBA-MenW	Forma 1T	45	100.0	92.1	100.0
		Forma 2T	43	97.7	87.7	99.9
		Forma 3T	45	100.0	92.1	100.0
		Meningitec ^{MR}	46	15.2	6.3	28.9
20	SBA-MenY	Forma 1T	47	97.9	88.7	99.9
		Forma 2T	44	88.6	75.4	96.2
		Forma 3T	45	93.3	81.7	98.6
		Meningitec ^{MR}	49	4.1	0.5	14.0

La Tabla 9 muestra los números de sujetos que alcanzaron titulaciones de SBA sobre los puntos de corte de 1:8 y 1:128, así como GMTs.

Tabla 9. Índices de seropositividad y GMTs para los anticuerpos SBA un mes después de la vacunación

5		Grupo	N	%	≥1:8 LL	UL	%	≥1:128 LL	UL	GMT
	SBA-MenA	Forma 1T	46	100	92.3	100	100	92.3	100	1457.3
		Forma 2T	45	100	92.1	100	97.8	88.2	99.9	1776.9
		Forma 3T	48	97.9	88.9	99.9	97.9	88.9	99.9	1339.5
		Meningitec ^{MR}	41	51.2	35.1	67.1	43.9	28.5	60.3	42.8
10	SBA-MenC	Forma 1T	47	97.9	88.7	99.9	78.7	64.3	89.3	281.3
		Forma 2T	45	100	92.1	100	84.4	70.5	93.5	428.6
		Forma 3T	47	95.7	85.5	99.5	85.1	71.7	93.8	478.4
		Meningitec ^{MR}	50	94.0	83.5	98.7	62.0	47.2	75.3	200.1
15	SBA-MenW	Forma 1T	47	100	92.5	100	100	92.5	100	2529.1
		Forma 2T	45	100	92.1	100	100	92.1	100	2501.6
		Forma 3T	48	100	92.6	100	97.9	88.9	99.9	2300.2
		Meningitec ^{MR}	48	27.1	15.3	41.8	6.3	1.3	17.2	9.4
20	SBA-MenY	Forma 1T	47	100	92.5	100	100	92.5	100	1987.4
		Forma 2T	45	100	92.1	100	100	92.1	100	2464.8
		Forma 3T	48	100	92.6	100	97.9	88.9	99.9	2033.7
		Meningitec ^{MR}	49	49.0	34.4	63.7	28.6	16.6	43.3	25.0

La vacunación con las tres formulaciones del conjugado de polisacárido ACWY-TT condujo a buenas respuestas de SBA contra MenA, MenC, MenW, y MenY, teniendo del 95 al 100 por ciento de los sujetos titulaciones mayores de 1:8. En particular, las

5 formulaciones 5/5/5/5 y 2.5/10/2.5/2.5 de los conjugados de polisacáridos produjeron una respuesta más alta contra MenC que la vacuna de oligosacárido Meningitec^{MR}, como se ve por una proporción más alta de los sujetos que tuvieron una titulación mayor de 1:128 y las lecturas de GMT.

Tabla 10. Índices de seropositividad y GMCs para los anticuerpos anti-polisacárido un mes después de la vacunación

10		Grupo	N	%	≥0.3µg/ml LL	UL	%	≥2µg/ml LL	UL	GMC µg/ml
	Anti-MenA	Forma 1T	47	93.6	82.5	98.7	68.1	52.9	80.9	2.35
		Forma 2T	45	100	92.1	100	64.4	48.8	78.1	3.11
		Forma 3T	48	95.8	85.7	99.5	37.5	24.0	52.6	1.65
15		Meningitec ^{MR}	50	10.0	3.3	21.8	2.0	0.1	10.6	0.18
	Anti-MenC	Forma 1T	47	100	92.5	100	100	92.5	100	9.57
		Forma 2T	45	100	92.1	100	100	92.1	100	12.53
		Forma 3T	47	100	92.5	100	97.9	88.7	99.9	19.29
20		Meningitec ^{MR}	49	98.0	89.1	99.9	93.9	83.1	98.7	7.95
	Anti-MenW	Forma 1T	47	100	92.5	100	80.9	66.7	90.9	4.56
		Forma 2T	45	100	92.1	100	93.3	81.7	98.6	6.83
		Forma 3T	48	93.8	82.8	98.7	72.9	58.2	84.7	2.88
		Meningitec ^{MR}	50	0.0	0.0	7.1	0.0	0.0	7.1	0.15
25	Anti-MenY	Forma 1T	47	100	92.5	100	97.9	88.7	99.9	8.90
		Forma 2T	45	100	92.1	100	100	92.1	100	12.78

5

	Grupo	N	%	≥0.3μ g/ml LL	UL	%	≥2μg/ ml LL	UL	GMC μg/ml
	Forma 3T	47	97.9	88.7	99.9	87.2	74.3	95.2	5.67
	Meningitec ^{MR}	50	2.0	0.1	10.6	0.0	0.0	7.1	0.15

10

Las tres formulaciones de la vacuna conjugada de polisacárido ACWY-TT produjeron buenas respuestas inmunes contra MenA, MenC, MenW, y MenY, alcanzando entre el 93 por ciento y el 100 por ciento de los sujetos titulaciones mayores de 0.3 microgramos/mililitro. Se lograron lecturas más altas de GMC utilizando las formulaciones 5/5/5/5 y 2/5/10/2.5/2.5 de la vacuna conjugada de polisacárido ACWY-TT en comparación con Meningitec^{MR}.

15

Ejemplo 7 - Comparación de la inmunogenicidad de los conjugados de polisacáridos MenY nativo y dimensionado

20

Los ratones (DBA hembras/2 de 6 a 8 semanas) recibieron dos inyecciones, con dos semanas de separación, de PSY-TT, por la vía subcutánea. Se tomaron muestras de sangre 14 días después de la segunda inyección, con el objeto de llevar a cabo el ELISA anti-SPY y el SBA utilizando la cepa MenY S1975. Por inyección, los ratones recibieron 1 microgramo de PSY-TT (formulación no adsorbida lyo).

25

Se utilizaron los conjugados descritos en la Tabla 11.

Tabla 11

Conjugados	ENYTT012	ENYTT014	ENYTT015 bis
Microfluidización de PSY	No	Sí (40 ciclos)	Sí (20 ciclos)
Proporción de TT/PS	1/1	1/1	1/1

Resultados

Los resultados (Figura 1) muestran una tendencia hacia una inmunogenicidad más alta para los conjugados preparados utilizando el PSY dimensionado. La Figura 1A muestra los resultados de GMC obtenidos en un ELISA para los antisueros reproducidos contra los conjugados preparados a partir del MenY nativo (ENYTT012), el MenY microfluidizado - 40 ciclos (ENYTT014), y el MenY microfluidizado - 20 ciclos (ENYTT015). Las GMCs más altas se obtuvieron cuando se preparó MenY-TT a partir de MenY microfluidizado.

Se obtuvieron resultados similares cuando se evaluaron los antisueros mediante el ensayo de SBA (Figura 1B). Nuevamente, se alcanzaron valores más altos de GMT utilizando los conjugados preparados a partir de MenY microfluidizado.

Ejemplo 8 - Estudio clínico que evalúa el efecto de un enlazante en MenA en una vacuna conjugada de MenACWY

Se administró una sola dosis de diferentes formulaciones de la vacuna de MenACWY a adolescentes de 15 a 19 años de edad en

cinco grupos de 25 sujetos, en un estudio de selección aleatoria de 1:1:1:1:1. Las formulaciones probadas fueron:

F1 - MenACWY conjugado con toxoide de tétanos, conteniendo el conjugado de MenA un espaciador de AH-5/5/5/5 microgramos.

5 F2 - MenACWY conjugado con toxoide de tétanos, conteniendo el conjugado de MenA un espaciador de AH-2.5/5/2.5/2.5 microgramos.

F3 - MenACWY conjugado con toxoide de tétanos, conteniendo el conjugado de MenA un espaciador de AH-5/5/2.5/2.5 microgramos.

10 F4 - MenACWY conjugado con toxoide de tétanos, sin espaciador en ningún conjugado - 5/5/5/5 microgramos.

Grupo de control - Mencevax^{MR} ACWY.

En el día 30 después de la inoculación, se tomó una muestra de sangre de los pacientes.

15 Las muestras de sangre se utilizaron para evaluar el porcentaje de los respondentes 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 los sujetos inicialmente seronegativos - una titulación de anticuerpo después de la vacuna de
20 $\geq 1/32$ en un mes, ó 2) para los sujetos inicialmente seropositivos - una titulación de anticuerpo ≥ 4 veces la titulación de anticuerpo antes de la vacunación.

Resultados

25 Como se muestra en la Tabla 13, el uso de un espaciador en el conjugado de MenA condujo a una mayor respuesta inmune contra

MenA. El porcentaje de respondente se elevó desde el 66 por ciento hasta el 90-95 por ciento cuando se agregó el espaciador de AH. Esto se reflejó en un aumento en SBA GMT desde 4,335 hasta 10,000, y un aumento en GMC desde 5 hasta 20-40. De una manera sorprendente, el uso de un espaciador de AH también condujo a una mayor respuesta inmune contra MenC, como se ve por un aumento en el porcentaje de respondentes y un aumento en SBA GMT. También se pudo ver un aumento en SBA GMT contra MenY (6742-7122 y contra MenW (4621-5418) cuando se introdujo un espaciador.

Tabla 12

Formulación	% de respondentes a SBA MenA	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
Mencevax™	85.7	8022	27.39

25

5

10

Formulación	% de respondentes a SBY MenY	SBA-MenY GMT	Anti-PSY GMC µg/ml ELISA
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™	91.7	4854	21.02

Ejemplo 9 - Estudio clínico que evalúa el efecto de un enlazante en conjugados de MenA y MenC en una vacuna conjugada de MenACWY

15

Se administró una sola dosis de diferentes formulaciones de vacuna MenACWY a adolescentes de 15 a 19 años de edad en cinco grupos de 24 sujetos, en un estudio de selección aleatoria de 1:1:1:1:1. Las formulaciones probadas fueron:

20

F1 - MenACWY conjugado con toxoide de tétanos, conteniendo los conjugados de MenA y MenC un espaciador de AH-2.5/2.5/2.5/2.5 microgramos.

F2 - MenACWY conjugado con toxoide de tétanos, conteniendo los conjugados de MenA y MenC un espaciador de AH-5/5/2.5/2.5 microgramos.

25

F3 - MenACWY conjugado con toxoide de tétanos, conteniendo los conjugados de MenA y MenC un espaciador de AH-5/5/5/5

microgramos.

F4 - MenACWY conjugado con toxoide de tétanos, conteniendo el conjugado MenA un espaciador de AH-5/5/5/5 microgramos.

Grupo de control - Mencevax^{MR} ACWY.

5 En el día 30 después de la inoculación, se tomó una muestra de sangre de los pacientes.

Las muestras de sangre se utilizaron para evaluar el porcentaje de respondentes a SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW135, y SBA-MenY, un mes después de la dosis de vacuna. Una respuesta a la
10 vacuna se definió como 1) para los sujetos inicialmente seronegativos - una titulación de anticuerpo después de la vacunación de $\geq 1/32$ en un mes, ó 2) para los sujetos inicialmente seropositivos - una titulación de anticuerpo de ≥ 4 veces la titulación de anticuerpo antes de la vacunación.

15

Resultados

La introducción de un espaciador de AH en el conjugado de MenC condujo a un aumento en la respuesta inmune contra MenC, como se muestra en la Tabla 14. Esto se demuestra por un aumento
20 en SBA GMT desde 1943 hasta 4329, y un aumento en anti-PSC GMC desde 7.65 hasta 13.13. Se mantuvieron buenas respuestas inmunes contra MenA, MenW, y MenY.

25

Tabla 13

5

10

15

20

25

Formulación	% de respondentes a SBA MenA	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
Mencevax ^{MR}	78.3	8284	12.93
Formulación	% de respondentes a SBA MenC	SBA-MenC GMT	Anti-PSC 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
F3 5AH/5AH/5/5	95.8	4329	13.13
F4 5AH/5/5/5	95.8	1943	7.65
Mencevax ^{MR}	91.7	1567	16.55

5

10

15

20

25

Formulación	% de respondentes a SBA MenW	SBA-MenW GMT	Anti-PSW GMC µg/ml ELISA
F1 2.5AH/2.5AH/2.5/2.5	100	5656	7
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	96	4679	5.4
F3 5AH/5AH/5/5	91.3	4422	4.45
F4 5AH/5/5/5	88	4947	7.67
Mencevax ^{MR}	96	3486	11.93
Formulación	% de respondentes a SBY MenY	SBA-MenY GMT	Anti-PSY 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 ^{MR}	88	3056	21.41

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica, la cual comprende cuando menos dos sacáridos capsulares de *N. meningitidis* diferentes, en donde uno o más se seleccionan a partir de un primer grupo que consiste en MenA, MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan a través de un enlazante con una proteína portadora, y uno o más sacáridos diferentes se seleccionan a partir de un segundo grupo que consiste en MenA, MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan directamente con proteína(s) portadora(s).

2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, la cual comprende cuando menos dos sacáridos capsulares de *N. meningitidis* diferentes, en donde uno o más se seleccionan a partir de un primer grupo que consiste en MenA y MenC, los cuales se conjugan a través de un enlazante con proteína(s) portadora(s), y uno o más sacáridos diferentes se seleccionan a partir de un segundo grupo que consiste en MenC, MenY y MenW, los cuales se conjugan directamente con proteína(s) portadora(s).

3. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, la cual comprende el sacárido capsular MenA conjugado a través de un enlazante con una proteína portadora, y el sacárido capsular MenC directamente conjugado con una

proteína portadora.

4. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, la cual comprende el sacárido capsular MenC conjugado a través de un enlazante con una proteína portadora, y el
5 sacárido capsular MenY conjugado directamente con una proteína portadora.

5. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, la cual comprende los sacáridos capsulares MenA y MenC
10 conjugados a través de un enlazante con proteína(s) portadora(s), y los sacáridos capsulares MenY y MenW conjugados directamente con proteína(s) portadora(s).

6. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, la cual comprende el sacárido capsular MenA conjugado a
15 través de un enlazante con una proteína portadora, y los sacáridos capsulares MenC, MenY, y MenW conjugados directamente con proteína(s) portadora(s).

7. Una composición inmunogénica, la cual comprende
20 cuando menos dos sacáridos diferentes conjugados por separado con el mismo tipo de proteína portadora, en donde uno o más sacáridos se conjugan con la proteína portadora por medio de un primer tipo de grupo químico sobre la proteína portadora, y uno o más sacáridos se conjugan con la proteína
25 portadora por medio de un segundo tipo de grupo químico sobre

la proteína portadora.

8. La composición inmunogénica de la reivindicación 7, en donde el uno o más sacáridos conjugados con la proteína portadora por medio del primer tipo de grupo químico sobre la proteína portadora, son diferentes del uno o más sacáridos conjugados con la proteína portadora por medio del segundo tipo de grupo químico sobre la proteína portadora.

9. Una composición inmunogénica de la reivindicación 7 u 8, la cual comprende cuando menos dos sacáridos diferentes conjugados por separado con la misma proteína portadora, en donde uno o más sacáridos se conjugan con la proteína portadora por medio de un grupo carboxilo sobre la proteína portadora, y uno o más sacáridos se conjugan con la proteína portadora por medio de un grupo amino sobre la proteína portadora.

10. Una composición inmunogénica de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el primero y segundo tipos de grupos químicos sobre la proteína portadora, están presentes sobre epítopos separados de células-B y/o de células-T sobre la proteína portadora.

11. Una composición inmunogénica de las reivindicaciones 7 a 10, en donde los sacáridos se seleccionan a partir del grupo que consiste en: sacárido capsular del

serogrupo A de *N. meningitidis* (MenA), sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC); sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis* (MenY), sacárido capsular del serogrupo W de *N. meningitidis* (MenW), sacárido capsular del grupo I de *Streptococcus* grupo B, sacárido capsular del grupo II de *Streptococcus* grupo B, sacárido capsular del grupo III de *Streptococcus* Grupo B, sacárido capsular del grupo IV de *Streptococcus* grupo B, sacárido capsular del grupo V de *Streptococcus* grupo B, sacárido capsular tipo 5 de *Staphylococcus aureus*, sacárido capsular tipo 8 de *Staphylococcus aureus*, sacárido Vi de *Salmonella typhi*, LPS de *N. meningitidis* (tal como L3 y/o L2), LPS de *M. catarrhalis*, LPS de *H. influenzae*, y de cualquiera de los sacáridos neumocócicos capsulares, tales como de los serotipos: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, ó 33F.

12. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada sacárido capsular de *N. meningitidis* se conjuga con una proteína portadora independientemente seleccionada a partir del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, y proteína D.

13. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada sacárido capsular de

N. meningitidis se conjuga con la misma proteína portadora seleccionada a partir del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, y proteína D.

5 14. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada sacárido capsular de *N. meningitidis* se conjuga con TT.

10 15. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada sacárido capsular de *N. meningitidis* se conjuga por separado con una proteína portadora separada.

15 16. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cuando menos uno, dos, o tres conjugados de sacáridos capsulares de *N. meningitidis*, se conjugan directamente con una proteína portadora.

20 17. La composición inmunogénica de la reivindicación 16, en donde MenW y/o MenY, MenW y/o MenC, MenY y/o MenC, o MenW y/o MenY, se conjugan directamente con una proteína portadora.

25 18. La composición inmunogénica de la reivindicación 16 ó 17, en donde cuando menos uno, dos, o tres conjugados de sacárido de *N. meningitidis* se conjugan directamente mediante la química de CDAP.

19. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde cuando menos uno, dos, o tres sacáridos capsulares de *N. meningitidis*, se conjugan con la proteína portadora por medio de un enlazante.

5

20. La composición inmunogénica de la reivindicación 19, en donde el enlazante es bifuncional.

10

21. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual comprende sacáridos capsulares de *N. meningitidis* a partir de cuando menos dos de los serogrupos A, C, W135, e Y, conjugados con una proteína portadora, para producir un conjugado de sacárido capsular de *N. meningitidis*, en donde el tamaño promedio de cada sacárido de *N. meningitidis* es mayor de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa, ó 130 kDa.

15

20

22. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual comprende además un sacárido capsular de *H. influenzae* b (Hib) conjugado con una proteína portadora, seleccionándose opcionalmente esta proteína portadora a partir del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, y proteína D.

25

23. La composición inmunogénica de la reivindicación 22, la cual comprende un conjugado de sacárido de Hib, y cuando menos dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales, en

donde el conjugado de Hib está presente en una dosis más baja que la dosis promedio de los cuando menos dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales.

5 24. Una vacuna, la cual comprende la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

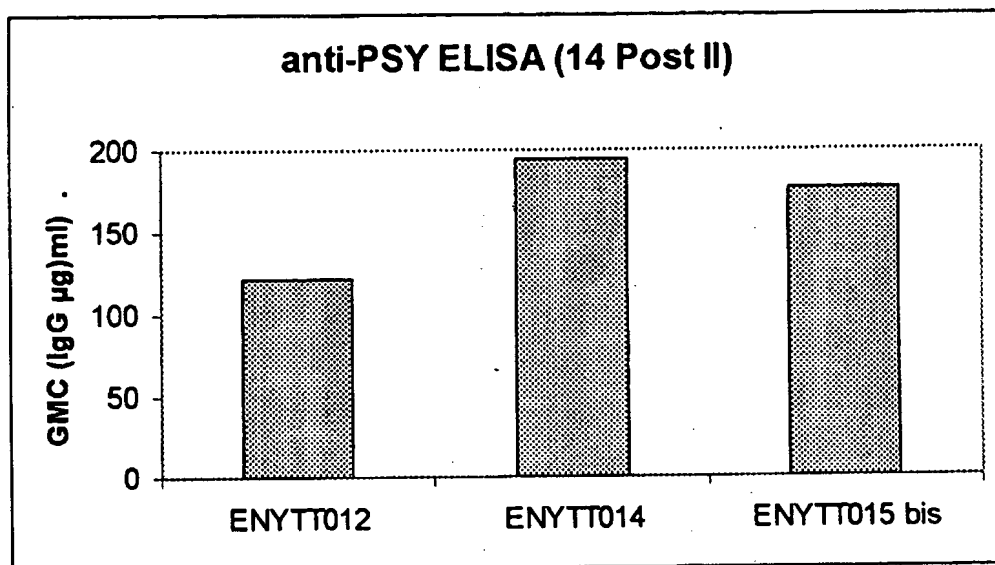
10 25. Un kit de vacuna para su administración concomitante o en secuencia, el cual comprende dos composiciones inmunogénicas multivalentes para conferir protección en un hospedero contra una enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Haemophilus influenzae*, y *Neisseria meningitidis*, comprendiendo este kit un primer recipiente que comprende:

15 toxoide de tétanos (TT),
toxoide de difteria (DT), y
componentes de tosferina de células enteras o acelulares,
y un segundo recipiente que comprende:

20 la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

25 26. Un proceso para la elaboración de la vacuna de la reivindicación 24, el cual comprende el paso de mezclar la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

A



B

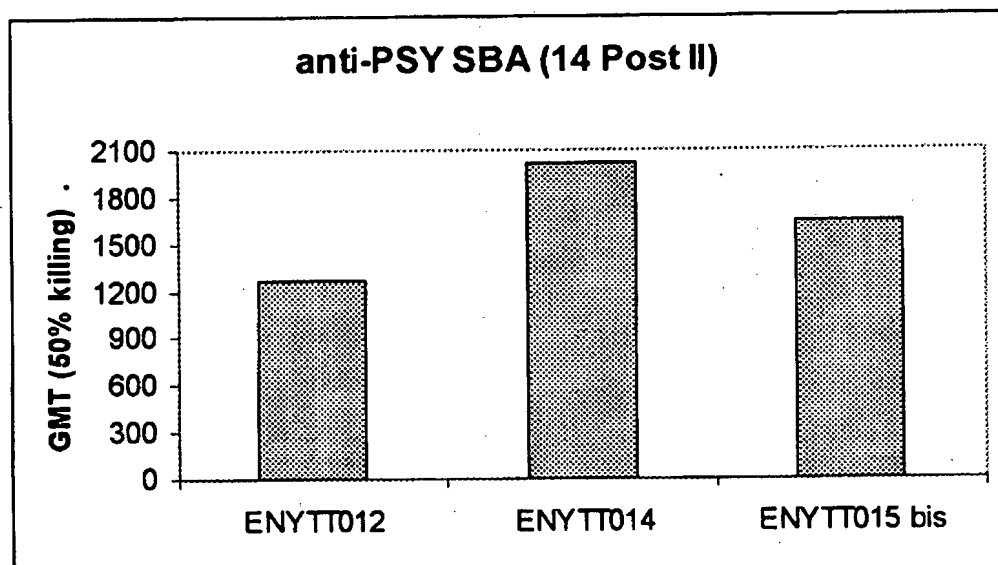


FIG 1

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 312/08 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCÉS, EL CUAL PARA SU IDENTIFICACIÓN SE SELLA CON EL SELLO DEL TRADUCTOR. ESTA ES UNA TRADUCCIÓN OFICIAL EFECTUADA EL DIA 21 DE ABRIL 2008 POR JEAN-JACQUES TURPIN, C.E.: 193849 DE BOGOTÁ, TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL SEGÚN RESOLUCIÓN No. 2680/91 DEL 19 DE DICIEMBRE DE 1991, EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA.

Autenticaciones que se hallan a continuación de un documento de cesión conferido en inglés y español por **Ralph Leon BIEMANS, Dominique BOUTRIAU, Carine CAPIAU, Philippe DENOEL, Pierre DUVIVIER y Jan POOLMAN**, quienes declaran ceder a la sociedad **GlaxoSmithKline Biologicals s.a.**, una compañía organizada bajo las leyes de **Bélgica**, domiciliada en **Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica**, todos sus derechos, título e intereses sobre su invención tal como describe en: **COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA** en lo que concierne a la República de Colombia.

Dado y firmado en Rixensart, el 17 de marzo de 2008 por Ralph Leon BIEMANS, Philippe DENOEL y Pierre DUVIVIER, el 13 de marzo de 2008 por Dominique BOUTRIAU, el 29 de febrero de 2008 por Carine CAPIAU, y por Jan POOLMAN.

Legalización de la firma de Ralph BIEMANS, Dominique BOUTRIAU, Carine CAPIAU, Philippe DENOEL, Pierre DUVIVIER y Jan POOLMAN. Firma ilegible del Notario.

Sello: Dominique Vinel, Notario en Rixensart (Genval).

APOSTILLA

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

1. - País: Bélgica
El presente documento público
2. - ha sido firmado por Vinel Dominique
3. - obrando en calidad de Notario
4. - con sello de Notario en Rixensart

CERTIFICADO

5. - En Bruselas
6. - El 1º de abril 2008
7. - Por el Servicio público federal de Relaciones Exteriores, Comercio exterior y Cooperación para el Desarrollo
8. - Bajo el número **9805080401531267**
9. - Sello: Servicio público federal de Relaciones Exteriores, Comercio exterior y Cooperación para el Desarrollo
10. - Firma ilegible de Nathalie Lacroix.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para confrontación y a la cual me remito.

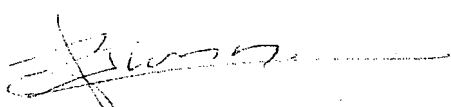
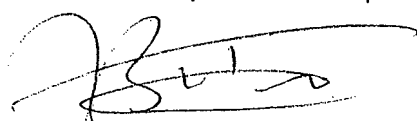
Traducción oficial No. 312/08.

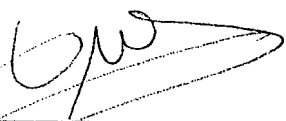
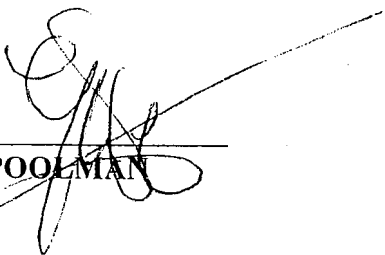
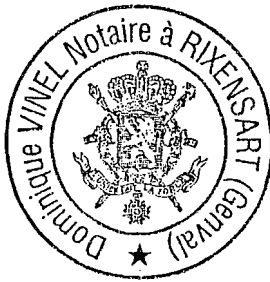
Traductor: Jean-Jacques Turpin

Bogotá, D.C., 21 de abril 2008.

Traducción Oficial No. 312/08
JEAN + JACQUES H. TURPIN
Traductor e Intérprete Oficial
FRANCOES - ESPAÑOL
Res. Minjusticia No. 2680/91



ASSIGNMENT	CESION
Ralph Leon BIEMANS Dominique BOUTRIAU Carine CAPIAU Philippe DENOEL Pierre DUVIVIER Jan POOLMAN By means of this document assign to GlaxoSmithKline Biologicals s.a. A company organized under the laws of Belgium Domiciled in rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Belgium (hereinafter referred to as the ASSIGNEE). All my (our) rights, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful improvement entitled and as fully set forth and described in: IMMUNOGENIC COMPOSITION So far as the Republic of Colombia is concerned. Place and date: <i>Rixensart March 17th 08</i>  Ralph Leon BIEMANS Place and date: <i>Rixensart, 13 March 08</i>  Dominique BOUTRIAU Place and date: <i>29.02.08</i>  Carine CAPIAU	Ralph Leon BIEMANS Dominique BOUTRIAU Carine CAPIAU Philippe DENOEL Pierre DUVIVIER Jan POOLMAN por medio de la present cedo (cedemos) a GlaxoSmithKline Biologicals s.a. una sociedad organizada baja las leyes de Bélgica domiciliada en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica (de ahora en adelante el CESIONARIO), todos mis (nuestros) derechos, título e interes sobre mi (nuestra) invencion tal como describe en: COMPOSICION INMUNOGENICA En lo que concierne a la Republica de Colombia. Place and date: Rixensart, marzo 17, 2008

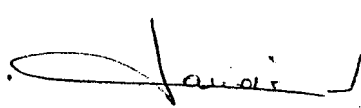
Place and date: <i>Rixensart, March 17, 2008</i>  Philippe DENOEL Place and date: <i>Rixensart, March 17, 2008</i>  Pierre DUVIVIER Place and date:  Jan POOLMAN	Dominique VINEL, notary public at Rixensart, hereby certifies that this (these) is (are) the authentic signature(s) of <i>Ralph Biemans, Dominique Bauthieu, Corine Copiau, Philippe Denoel and Pierre Duvivier, Jan Poolman.</i>  
--	--

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1. Pays: Belgique
- 2. Le présent acte public a été signé par: Vinel, Dominique
- 3. Agissant en qualité de: Notaire
- 4. Est revêtu du sceau / timbre de: Notaire
Rixensart
- Attesté**
- 5. A Bruxelles
- 6. Le: 01/04/2008
- 7. Par le Service public fédéral Affaires étrangères, Commerce extérieur et Coopération
au Développement
- 8. Sous le n°: **9805080401531267**
- 9. Sceau/timbre:
- 10. Signature:




Lacroix Nathalie