



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Organización de la Ley



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

07-136747

54. TITULO "COMPOSICIÓN INMUNOGENICA"

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.

27 DIC 2007

(FORMA P 10)

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-136747- -00000-0000

Fecha: 2007-12-27 16:44:47 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 166

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

27 ene 2008

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA

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

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart, Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

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

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

4

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: BIEMANS, Ralph, Leon; BOUTRIAU, Dominique; CAPIAU, Carine; DENOEL, Philippe; DUVIVIER, Pierre y POOLMAN, Jan.

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

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2006/006269

Fecha: 23/06/06

Publicación Internacional No. WO 2007/000342 A3

Fecha: 04/01/07

6

Título (54) COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA

Vacuna de conjugados de sustratos de Neisseria Meningitidis (ver folio 170).

7

Clasificación Internacional (51) A61K 39/095

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

GB
GB
GB
GB

27/06/05
28/07/05
28/11/05
21/12/05

0513069.5
0515556.9
0524204.5
0526040.1
0513071.1
0526041.9

9

Comprobante de Pago No. 07-98,726

Fecha: Diciembre 4 de 2007

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (resumen, descripción, reivindicaciones y dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, Opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 98,726
FECHA : DICIEMBRE 4 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-136747- -00000-0000

Fecha: 2007-12-27 16:44:47 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTE IYII Eve. 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 166

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	72074913	04/12/2007	9,522,900.00

***** CONCEPTO *****

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

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

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


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

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

PODER

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

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

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

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

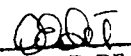
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

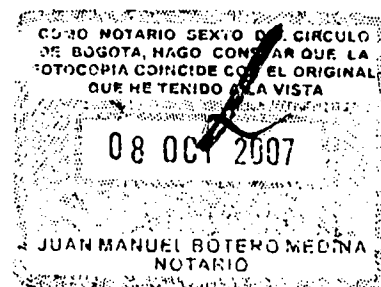
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

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

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

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

2004 SET 10 A 10:47

ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

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

08 07 2007

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

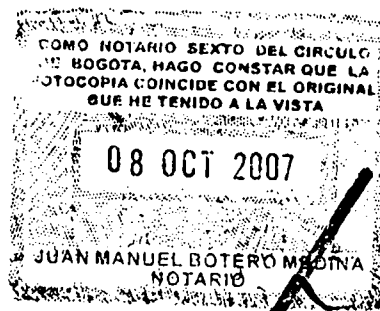
W. Glass
Por el Secretario de Estado

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

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

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



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

CERTIFICO:

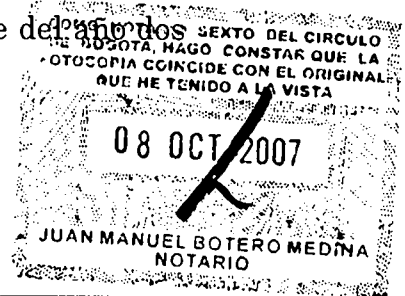
QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada "**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**" (anteriormente denominada "**Smithkline Beecham Biologicals s.a.**"), 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

SCRIPHER
NOTES



APOSTILLE

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

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

This public document/Le présent acte public

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

Certified/Attesté

5. at London/à Londres
6. the/le 01 OCT 2007
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No G 749037

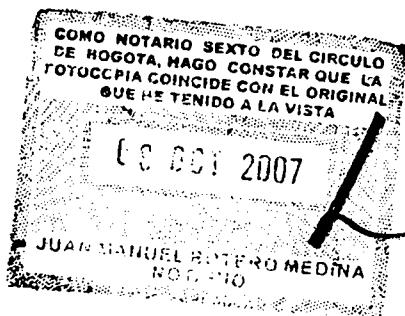
9. Stamp:
timbre:



10. Signature: W GLASS

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

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



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

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

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

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

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

Dado y firmado

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

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

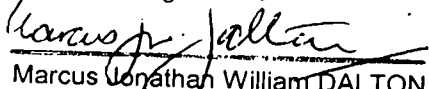
hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial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

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

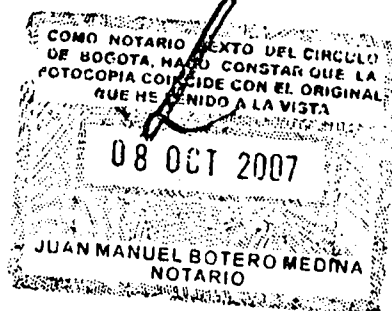
We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

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

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

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

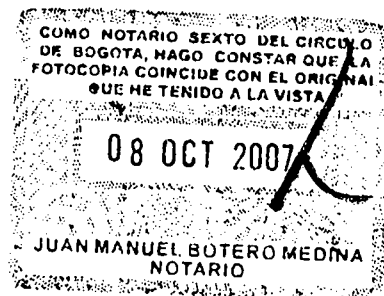
On this day of 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

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:		(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
	0513069.5	0513071.1	27-06-05
	0515556.9	28-07-05	GB
	0524204.5	28-11-05	GB
	0526040.1	0526041.9	21-12-05
			GB
		(72) Inventor(es) BIEMANS, Ralph, Leon; BOUTRIAU, Dominique; CAPIAU, Carine; DENOEL, Philippe; DUVIVIER, Pierre y POOLMAN, Jan.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(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:		COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA	

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).



Industria y Comercio

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA **PATENTE DE INVENCION** ____ **PCT** ☒ **MODELO DE UTILIDAD** ____ **DISEÑO INDUSTRIAL** ____

(21) N° de solicitud:

(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: COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA



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: _____ (22) Fecha de solicitud: 27-12-07
(23) Clasificación Internacional: A61K 39/095
(24) 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
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 23-06-06
No. de solicitud PCT/EP2006/006269
(87) Publicación internacional:
Fecha: 04-01-2007
No. Publicación: WO 2007/000342 A3

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Título: COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA

(57) Resumen:

Reivindicación número 1.-

La 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).

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

Registro de referencia del solicitante o agente CLJ/VB61473	PARA FUTURAS ACCIONES ver Forma PCT/ISA/220 así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/EP2006/006269	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 23/06/2006	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 27/06/2005

Solicitante
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

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

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 5 hojas.

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

1. Bases del reporte

a. Respecto al **lenguaje**, la búsqueda internacional se llevó a cabo según:

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

☐ la traducción de la solicitud internacional en _____, el cual es el lenguaje de la traducción proporcionada para el propósito de la búsqueda internacional (Reglas 12.3 (a) y 23.1(b)).

b. ☐ Respecto a una secuencia de **ácido nucleótido y/o amino revelado** en la solicitud internacional, ver casilla I.

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

3. ☐ **Falta unidad de invención** (ver Recuadro III).

4. Respecto al **título**,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

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

5. Respecto al **resumen**,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los **dibujos**,

a. la figura de los **dibujos** que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

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

☐ como lo sugirió la autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención-

b. ☒ Ninguna de las figuras se publicara en el resumen.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2006/006269

A. CLASIFICACION DE MATERIA

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

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)
A61K

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

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

EPO-Interno, Dato WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 2004/103400 A (AVENTIS PASTEUR INC [US]; RYALL ROBERT P [US]) 2 de diciembre de 2004 (2004-12-02) página 6, línea 11-página 7, línea 21 página 9, línea 4- página 10, línea 2 reivindicaciones; ejemplos	1-106
A	----- WO 03/080678 A (CHIRON SRL [IT]; COSTANTINO PAOLO [IT]; BERTI FRANCESCO [IT]; NORELLI) 2 de Octubre de 2003 (2003-10-02) página 1, línea 4-línea 26 página 11, línea 12-línea 29 página 12, línea 15-línea 20 página 14, línea 17-línea 27 página 14, línea 32-página 15, línea 13 página 26, línea 6-línea 9 reivindicaciones; ejemplos	1-106

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

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

° Categorías especiales de documentos citados:

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

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

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

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

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

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

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

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

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

26 de Marzo de 2007

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

05/04/2007

Nombre y dirección de correo de ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Rankin, Robert

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/EP2006/006269

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	WO 03/007985 A (CHIRON SPA [IT]; COSTANTINO PAOLO [IT] CHIRON SRL [IT]; COSTANTINO PAO) 30 de enero de 2003 (2003-01-30) página 1, línea 29-línea 32 página 4, línea 12-página 6, línea 14 página 8, línea 1-línea 32 página 15, línea 10-línea 18 reivindicaciones; ejemplos	1-106

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional No.
PCT/EP2006/006269

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

Aunque la reivindicación 77 está dirigida a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.

2. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:

3. ☐ Reivindicaciones No.:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

información sobre miembros familias de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2006/006269

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda		Fecha de publicación		Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 2004103400	A	02-12-2004	AU	2004240558 A1	02-12-2004
			BR	PI0410341 A	30-05-2006
			CA	2524860 A1	02-12-2004
			CN	1852733 A	25-10-2006
			EP	1624888 A2	15-02-2006
			JP	2006528936 T	28-12-2006
WO 03080678	A	02-10-2003	AU	2003216633 A1	08-10-2003
			BR	0308768 A	15-02-2005
			CA	2480389 A1	02-10-2003
			EP	1490409 A1	29-12-2004
			JP	2005526153 T	02-09-2005
			MX	PA04009339 A	25-01-2005
			NZ	535968 A	31-08-2006
WO 03007985	A	30-01-2003	AT	322287 T	15-04-2006
			BR	0210590 A	09-11-2004
			CA	2450203 A1	30-01-2003
			CN	1518456 A	04-08-2004
			DE	60210456 T2	16-11-2006
			DK	1401489 T3	03-07-2006
			EP	1401489 A2	31-03-2004
			ES	2261705 T3	16-11-2006
			JP	2004536859 T	09-12-2004
			MX	PA03011462 A	19-04-2005
			NZ	529881 A	31-03-2006
			NZ	544332 A	27-10-2006
			PT	1401489 T	31-08-2006
			US	2005106181 A1	19-05-2005

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference CLJ/VB61473	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2006/006269	International filing date (day/month/year) 23/06/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 27/06/2005
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

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

This international search report consists of a total of 5 sheets.

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

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒

the international application in the language in which it was filed

☐

a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

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

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

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

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

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

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

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

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

6. With regard to the **drawings**,

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

☐

as suggested by the applicant

☐

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

☐

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/006269

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/103400 A (AVENTIS PASTEUR INC [US]; RYALL ROBERT P [US]) 2 December 2004 (2004-12-02) page 6, line 11 - page 7, line 21 page 9, line 4 - page 10, line 2 claims; examples	1-106
A	WO 03/080678 A (CHIRON SRL [IT]; COSTANTINO PAOLO [IT]; BERTI FRANCESCO [IT]; NORELLI) 2 October 2003 (2003-10-02) page 1, line 4 - line 26 page 11, line 12 - line 29 page 12, line 15 - line 20 page 14, line 17 - line 27 page 14, line 32 - page 15, line 13 page 26, line 6 - line 9 claims; examples	1-106

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

Date of the actual completion of the international search

26 March 2007

Date of mailing of the international search report

05/04/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rankin, Robert

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/006269

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/007985 A (CHIRON SPA [IT]; COSTANTINO PAOLO [IT] CHIRON SRL [IT]; COSTANTINO PAO) 30 January 2003 (2003-01-30) page 1, line 29 - line 32 page 4, line 12 - page 6, line 14 page 8, line 1 - line 32 page 15, line 10 - line 18 claims; examples -----	1-106

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2006/006269

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

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

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

Although claim 77 is directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/006269

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004103400 A	02-12-2004	AU 2004240558 A1 BR PI0410341 A CA 2524860 A1 CN 1852733 A EP 1624888 A2 JP 2006528936 T	02-12-2004 30-05-2006 02-12-2004 25-10-2006 15-02-2006 28-12-2006
WO 03080678 A	02-10-2003	AU 2003216633 A1 BR 0308768 A CA 2480389 A1 EP 1490409 A1 JP 2005526153 T MX PA04009339 A NZ 535968 A	08-10-2003 15-02-2005 02-10-2003 29-12-2004 02-09-2005 25-01-2005 31-08-2006
WO 03007985 A	30-01-2003	AT 322287 T BR 0210590 A CA 2450203 A1 CN 1518456 A DE 60210456 T2 DK 1401489 T3 EP 1401489 A2 ES 2261705 T3 JP 2004536859 T MX PA03011462 A NZ 529881 A NZ 544332 A PT 1401489 T US 2005106181 A1	15-04-2006 09-11-2004 30-01-2003 04-08-2004 16-11-2006 03-07-2006 31-03-2004 16-11-2006 09-12-2004 19-04-2005 31-03-2006 27-10-2006 31-08-2006 19-05-2005

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

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



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

(10) Número de Publicación Internacional
PCT
WO 2007/000342 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:
A61K 39/095 (2006.01) A61K 39/116 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

B-1330 Rixensart (BE). POOLMAN, Jan [NL/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2006/006269

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

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

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

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

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

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

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

Publicado:
-- con reporte de Búsqueda Internacional
- Antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicadas de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

(72) Inventores: y

(75) Inventores/ solicitantes (para Estados Unidos solamente):
BIEMANS, Ralph, Leon [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
BOUTRIAU, Dominique [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
CAPIAU, Carine [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
DENOEL, Philippe [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
DUVIVIER, Pierre [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89,

(88) Fecha de la publicación del Reporte de Búsqueda Internacional
31 de Mayo de 2007

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

(54) Título: COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA

(57) Resumen: 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, 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).

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



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

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/000342 A3

(51) International Patent Classification:

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

Jan [NL/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(21) International Application Number:

PCT/EP2006/006269

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

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

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

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BIEMANS, Ralph, Leon [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). BOUTRIAU, Dominique [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). CAPIAU, Carine [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). DENOEL, Philippe [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). DUVIVIER, Pierre [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). POOLMAN,

Published:

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

(88) Date of publication of the international search report:
31 May 2007

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

(54) Title: IMMUNOGENIC COMPOSITION

(57) Abstract: The present application discloses an immunogenic composition comprising at least 2 different *N. meningitidis* capsular saccharides, wherein one or more is/are selected from a first group consisting of MenA, MenC, MenY and MenW which is/are conjugated through a linker to a carrier protein(s), and one or more different saccharides is/are selected from a second group consisting of MenA, MenC, MenY and MenW which is/are directly conjugated to a carrier protein(s).

WO 2007/000342 A3

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)
(PCT Artículo 36 v Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente CLJ/VB61473	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Forma PCT/IPEA/416																									
Solicitud Internacional No. PCT/EP 2006/006269	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 23.06.2006	Fecha de prioridad (día/mes/año) 27.06.2005																								
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV. A61K39/095																										
Solicitante .GlaxoSmithKline Biologicals s.a.																										
1. Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>7</u> hojas, incluyendo esta carátula. 3. Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden: a. ☐ (enviado al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de _____ hojas, como sigue: ☐ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas). ☐ hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No. I y la Casilla Suplementaria. b. ☐ (enviado únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) _____, que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).																										
4. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table><tr><td>☒</td><td>Casilla No. I</td><td>Bases del Reporte</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. II</td><td>Prioridad</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. III</td><td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. IV</td><td>Falta de unidad de invención</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. V</td><td>Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación .</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VI</td><td>Ciertos documentos citados</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VII</td><td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VIII</td><td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td></tr></table>			☒	Casilla No. I	Bases del Reporte	☐	Casilla No. II	Prioridad	☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.	☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación .	☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒	Casilla No. I	Bases del Reporte																								
☐	Casilla No. II	Prioridad																								
☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.																								
☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																								
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación .																								
☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																								
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																								
☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																								
Fecha de presentación de la demanda 2007-05-16	Fecha de terminación de este reporte 14.11.2007																									
Nombre y dirección de correo de la IPEA European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0 Tx. 523656 cpmu d Fax. +49 89 2399-4465	Funcionario autorizado Rankin, Robert Teléfono No. +49 89 2399-2659																									

Forma PCT/IPEA/409 (portada) (Abril 2005)

Casilla No. I Bases del reporte

1. Respecto al idioma, este reporte se basó en:

- ☒
 La solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó.
- ☐
 Una traducción de la solicitud internacional al, que es el lenguaje de una traducción entregada para propósitos de:

☐
 búsqueda internacional (según Reglas 12.3. y 23.1 (b)).

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

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

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

Descripción, páginas

1-50 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, números

1-106 como se presentaron originalmente

Dibujos/hojas

1/1 como se presentaron originalmente

☐
 la listado de secuencia y/o alguna tabla(s) - Ver Casilla Suplementaria relacionada al Listado de Secuencia

3. ☐
 Las modificaciones resultaron en la cancelación de:

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

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

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

*si el Item 4 aplica, algunas o todas aquellas hojas pueden ser marcadas “reemplazadas”

23

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD

Solicitud internacional No.
PCT/EP2006/006269

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

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

- ☐ toda la solicitud internacional
- ☒ las reivindicaciones Nos. 77 (por razones de aplicabilidad industrial)

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 77 (por razones de aplicabilidad industrial) se relaciona con la siguiente materia objeto las cuales no requieren examen preliminar internacional (*especificar*):

ver hoja separada

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):
- ☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa.
- ☐ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos.
- ☐ Una opinión no puede ser dada sin la lista de secuencias; el solicitante no lo hizo en el tiempo límite prescrito:
- ☐ Proporciona una lista de secuencias que cumpla con el estándar provisto por el anexo C de las instrucciones administrativas, y dicha lista no estaba disponible para la autoridad de búsqueda internacional en una forma o manera no aceptable para esto.
- ☐ Proporciona una lista de secuencias en forma electrónica que cumpla con el estándar provisto por el anexo C de las instrucciones administrativas y dicha lista no estaba disponible para la autoridad de búsqueda internacional en una forma o manera no aceptable para esto.
- ☐ Paga el costo por el requerimiento de una lista de secuencias en respuesta a la invitación bajo las reglas 13ter.1(a) o (b)
- ☐ Una opinión valida no puede ser formada sin las tablas relacionadas a la lista de secuencias; el solicitante no proporcionó, en el tiempo prescrito, dichas tablas en forma electrónica que cumple con los requerimientos provistos por el anexo C-bis de las instrucciones administrativas y dicha lista no estaba disponible para la autoridad de búsqueda internacional en una forma o manera no aceptable para esto.
- ☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver la hoja separada para más detalles

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

1. Afirmación

Novedad (N)	Si : Reivindicaciones	<u>1-106</u>
	No: Reivindicaciones	
Nivel Inventivo (IS)	Si : Reivindicaciones	<u>1-106</u>
	No: Reivindicaciones	
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si : Reivindicaciones	<u>1-106</u>
	No: Reivindicaciones	

2. Citaciones y explicaciones (Regla 70.7)

ver hoja separada

Re Ítem III

No se establece opinión con respecto a la novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial

La reivindicación 77 se relaciona con el objeto que esta Autoridad considera estar cubierto por las disposiciones de la Norma 67.1 (iv) PCT. Por consiguiente no se formulará ninguna opinión con respecto a la aplicabilidad industrial del objeto de esta reivindicación (Artículo 34(4)(a)(i) PCT)

Re Ítem V

Declaración motivada con respecto a la novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración

Para llevar a cabo la evaluación de la presente reivindicación 77 acerca de si es industrialmente aplicable, no existe un criterio unificado dentro de los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. El EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable el objeto de reivindicaciones para el uso de un compuesto en tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, el uso de dicho compuesto para la fabricación de algún medicamento para un tratamiento médico nuevo.

Documentos Registrados

Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: WO 2004/103400 A (AVENTIS PASTEUR INC [US]; RYALL ROBERT P [US]) 2 de diciembre de 2004 (2004-12-02)

D2: WO 03/080678 A (CHIRON SRL [IT]; COSTANTINO PAOLO [IT]; BERTI FRANCESCO [IT]; NORELLI) 2 de octubre de 2003 (2003-10-02)

Artículo 33(2) PCT

El objeto de las reivindicaciones 1-106 se considera novedoso.

El Documento D1 revela vacunas contra la *N. meningitidis*. Las preparaciones de la vacuna de esta revelación se basan en polisacáridos de los grupos *serum* A, C, W-135 o Y que se conjugan con una molécula de proteína portadora. La composición también puede abarcar dos o más polisacáridos capsulares conjugados con una o más proteínas portadoras. Los polisacáridos tienen un tamaño promedio de menos de 100,000 daltons. Entre los demás tamaños posibles de los polisacáridos, se mencionan los siguientes rangos (en daltons): 5,000 a 75,000 y 7,000 a 50,000 (en la página 6, renglón 11, hasta la página 7, renglón 21; página 9, renglón 4, hasta la página 10,

renglón 2; ejemplos; reivindicaciones).

Las vacunas de D1 no se conjugan usando diferentes tipos de métodos de conjugación hacia la proteína portadora.

Artículo 33(3) PCT

Con respecto a la reivindicación 1, D1 representa la técnica anterior más cercana, sin embargo, D1 no revela composiciones en las que un antígeno se conjugue directamente con un portador, y un segundo antígeno a través de un vinculante.

El efecto que surge de dicha diferencia es que las respuestas inmunes contra los antígenos conjugados se pueden optimizar.

El problema que se debe resolver se considerará por lo tanto, el suministro de una vacuna mejorada de polisacárido conjugado contra la *N. meningitidis*.

El objeto de la reivindicación 1 resuelve este problema (ver ejemplos 8 y 9) y se considera inventivo puesto que la persona calificada no hubiera considerado la solución como obvia, ya que D1 emplea un vinculante para todas las conjugaciones. El objeto de la reivindicación 1 es por lo tanto, inventivo (Artículo 33(3) PCT). Por consiguiente, las reivindicaciones 2-79, son también inventivas.

Con respecto a la reivindicación 80, D1 representa también la técnica anterior más cercana. La reivindicación 80 difiere de D1 en cuanto que los polisacáridos se conjugan a la proteína portadora a través de diferentes grupos químicos.

El efecto técnico de la diferencia es que los antígenos se pueden vincular al portador de tal manera que el receptor pueda optimizar su reconocimiento inmunológico.

El problema que se debe resolver se considerará por lo tanto, el suministro de una vacuna mejorada de polisacárido conjugado contra la *N. meningitidis*.

El objeto de la reivindicación 80 resuelve este problema (ver ejemplos 8 y 9) y se considera inventivo puesto que la persona calificada no hubiera considerado la solución como obvia, ya que D1 y D2 no revelan o sugieren el empleo de otros medios para vincular los antígenos al mismo portador. El objeto de la reivindicación 80 es por lo

tanto, inventivo (Artículo 33(3) PCT). Por consiguiente, las reivindicaciones 81-106, son también inventivas.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference CLJVB61473	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2006/006269	International filing date (day/month/year) 23.06.2006	Priority date (day/month/year) 27.06.2005	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K39/095			
Applicant GlaxoSmithKline Biologicals s.a.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 2007-05-16		Date of completion of this report 14.11.2007	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Rankin, Robert Telephone No. +49 89 2399-2659 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2006/006269

Box No. I Basis of the report

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

Description, Pages

1-50 as originally filed

Claims, Numbers

1-106 as originally filed

Drawings, Sheets

1/1 as originally filed

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

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

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2006/006269

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

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

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 77 (for reasons of industrial applicability)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 77 (for reasons of industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*).
- ☐ no international search report has been established for the said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b) and 13*ter*.2.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-106</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-106</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-106</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Re Item III

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

Claim 77 relates to subject matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject matter of this claim (Article 34(4)(a)(i) PCT)

Re Item V

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

For the assessment of the present claim 77 on the question whether it is industrially applicable, no unified criteria exist within the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as industrially applicable the subject matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Cited Documents

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 2004/103400 A (AVENTIS PASTEUR INC [US]; RYALL ROBERT P [US]) 2 December 2004 (2004-12-02)
D2: WO 03/080678 A (CHIRON SRL [IT]; COSTANTINO PAOLO [IT]; BERTI FRANCESCO [IT]; NORELLI) 2 October 2003 (2003-10-02)

Article 33(2) PCT

The subject matter of claims 1-106 are considered novel.

Document D1 discloses vaccines against *N. meningitidis*. The vaccine preparations of this disclosure are based on polysaccharides from serogroups A, C, W-135 or Y which are conjugated to a protein carrier molecule. The composition may also comprise two or more capsular polysaccharides conjugated to one or more carrier proteins. The polysaccharides have an average size of less than 100,000 daltons. Amongst the other possible sizes of the polysaccharides, the following ranges (in daltons) are mentioned: 5,000 to 75,000 and 7,000 to 50,000 (cf page 6, line 11 to page 7, line 21; page 9, line 4 to page 10, line 2;

examples; claims).

The vaccines of D1 are not conjugated using different types of conjugation methods to the carrier protein.

Article 33(3) PCT

For claim 1, D1 represents the closest prior art, however D1 does not disclose compositions where an antigen is conjugated to a carrier directly and a second via a linker.

The effect arising from this difference is that immune responses against the conjugated antigens may be optimised.

The problem to be solved may be therefore considered as being to provide an improved N.meningitidis conjugated polysaccharide vaccine.

The subject matter of claim 1 solves this problem (see examples 8 and 9) and is considered inventive because the skilled person would not have viewed the solution as being obvious as D1 employs a linker for all conjugations. The subject matter of claim 1 is therefore inventive (Article 33(3) PCT). Claims 2-79 are consequently also inventive.

For claim 80, D1 is also the closest prior art. Claim 80 differs from D1 in that the polysaccharides are conjugated to the carrier protein via different chemical groups.

The technical effect of the difference is that the antigens can be bound to the carrier in a way which optimises their immunological recognition by the recipient.

The problem to be solved may therefore be considered as being to provide an improved N.meningitidis conjugated polysaccharide vaccine.

The subject matter of claim 80 solves this problem (see examples 8 and 9) and is considered inventive because the skilled person would not have viewed the solution as being obvious as D1 and D2 do not disclose or suggest employing different means of binding the antigens to the same carrier. The subject matter of claim 80 is therefore

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2006/006269

inventive (Article 33(3) PCT). Claims 81-106 are consequently also inventive.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para: Ver forma PCT/ISA/220		PCT OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)																									
		Fecha de correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (Segunda hoja)																									
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220		PARA FUTURAS ACCIONES Ver párrafo 2 a continuación																									
Solicitud Internacional No. PCT/EP2006/006269	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 23.06.2006	Fecha de prioridad (día/mes/año) 27.06.2005																									
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV. A61K39/095 A61K39/102 A61K39/116 A61P31/04																											
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.																											
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table><tr><td>☒</td><td>Casilla No. I</td><td>Bases de la opinión</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. II</td><td>Prioridad</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. III</td><td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. IV</td><td>Falta de unidad de invención</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. V</td><td>Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VI</td><td>Ciertos documentos citados</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VII</td><td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VIII</td><td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td></tr></table> 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220. 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.				☒	Casilla No. I	Bases de la opinión	☐	Casilla No. II	Prioridad	☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial	☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación	☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒	Casilla No. I	Bases de la opinión																									
☐	Casilla No. II	Prioridad																									
☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial																									
☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																									
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación																									
☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																									
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																									
☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																									
Nombre y dirección de correo de la ISA Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399-4465		Fecha de finalización de esta opinión ver forma PCT/ISA/210	Funcionario Autorizado Rankin, Robert Teléfono No.+49 89 2399-2659																								

Casilla No. I Bases de la opinión

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

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

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

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 77 (por razones de aplicabilidad industrial)

porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 77 (por razones de aplicabilidad industrial) se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):
ver hoja separada

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

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

☐ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para la solicitud completa o para dichas reivindicaciones Nos.

☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin la lista de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:

☐ presentó una lista de secuencias en papel cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ presentó una lista de secuencias en formato electrónico cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ pagó los derechos de presentación tardía requeridos para la presentación de una lista de secuencias en respuesta a una invitación bajo las Reglas 13ter.1(a) o (b).

☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con la lista de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no presentó dichas tablas en formato electrónico cumpliendo con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas, y dichas tablas no estaban disponibles a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ las tablas relacionadas con la lista de secuencias nucleótidas y/o amino ácidas, si están en formato electrónico únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ Ver la Casilla Suplementaria para más detalles

OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDA DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2006/006269

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

1. Afirmación

Novedad (N)	Si :	Reivindicaciones	<u>1-79, 93-106</u>
	No:	Reivindicaciones	<u>80-92</u>

Nivel Inventivo (IS)	Si :	Reivindicaciones	
	No:	Reivindicaciones	<u>1-106</u>

Aplicabilidad Industrial (IA)	Si :	Reivindicaciones	<u>1-76, 78-106</u>
	No:	Reivindicaciones	

2. Citas y Explicaciones

ver hoja separada

Re Ítem III

No se establece opinión con respecto a la novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial

La reivindicación 77 se relaciona con el objeto que esta Autoridad considera estar cubierto por las disposiciones de la Norma 67.1 (iv) PCT. Por consiguiente no se formulará ninguna opinión con respecto a la aplicabilidad industrial del objeto de esta reivindicación (Artículo 34(4)(a)(i) PCT)

Re Ítem V

Declaración motivada con respecto a la novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración

Para llevar a cabo la evaluación de la presente reivindicación 77 acerca de si es industrialmente aplicable, no existe un criterio unificado dentro de los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. El EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable el objeto de reivindicaciones para el uso de un compuesto en tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, el uso de dicho compuesto para la fabricación de algún medicamento para un tratamiento médico nuevo.

Documentos Registrados

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: WO 2004/103400 A (AVENTIS PASTEUR INC [US]; RYALL ROBERT P [US]) 2 de diciembre de 2004 (2004-12-02) registrado en la aplicación
- D2: WO 03/080678 A (CHIRON SRL [IT]; COSTANTINO PAOLO [IT]; BERTI FRANCESCO [IT]; NORELLI) 2 de octubre de 2003 (2003-10-02)

Artículo 33(2) PCT

El objeto de las reivindicaciones 80-92 no cumple con los requisitos del Artículo 33(2) PCT.

El Documento D1 revela vacunas contra la N. meningitidis. Las preparaciones de la vacuna de esta revelación se basan en polisacáridos de los grupos serum A, C, W-135 o Y que se conjugan con una molécula de proteína portadora. La composición también puede abarcar dos o más polisacáridos capsulares conjugados con una o más proteínas portadoras. Los polisacáridos tienen un tamaño promedio de menos de 100,000 daltons. Entre los demás tamaños posibles de los polisacáridos, se mencionan los siguientes rangos (en daltons): 5,000 a 75,000 y 7,000 a 50,000 (en la página 6, renglón 11, hasta la página 7, renglón 21; página 9, renglón 4, hasta la página

10, renglón 2; ejemplos; reivindicaciones). A la luz del documento D1, las reivindicaciones 80-92 de la presente solicitud no son novedosas (Artículo 33(2) PCT).

El objeto de las reivindicaciones 1-79 y 93-106 es por tanto novedoso, con respecto a la técnica anterior.

Artículo 33(3) PCT

El objeto de las reivindicaciones 1-79 y 93-106 no es inventivo con respecto a la técnica anterior (Artículo 33(3) PCT).

El uso de una molécula de acople en la formación de un conjugado también podría ser obvio para la persona calificada (ver por ejemplo D2, página 14, renglones 17-27), como lo sería la incorporación de conjugados de *influenzae* H. y demás antígenos patógenos. Los coeficientes de proteína portadora a polisacáridos se consideran en D1. Además, la combinación de conjugados que tengan una molécula de acople con aquellos en los cuales los portadores y antígenos estén directamente ligados, sería una opción obvia para la persona calificada. La persona calificada consideraría por lo tanto el objeto de las reivindicaciones 1-79 y 93-106 como obvio. Conforme a lo anterior, dichas reivindicaciones no son inventivas (Artículo 33(3) PCT).

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

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

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

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

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2006/006269

International filing date (day/month/year)
23.06.2006

Priority date (day/month/year)
27.06.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/095 A61K39/102 A61K39/116 A61P31/04

Applicant
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

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

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

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Rankin, Robert

Telephone No. +49 89 2399-2659



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2006/006269

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

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

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

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 77 (for reasons of industrial applicability)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 77 (for reasons of industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
 - ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2006/006269

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-79, 93-106</u>
	No: Claims	<u>80-92</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-106</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-76, 78-106</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item III

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

Claim 77 relates to subject matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject matter of this claim (Article 34(4)(a)(i) PCT)

Re Item V

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

For the assessment of the present claim 77 on the question whether it is industrially applicable, no unified criteria exist within the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as industrially applicable the subject matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Cited Documents

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 2004/103400 A (AVENTIS PASTEUR INC [US]; RYALL ROBERT P [US]) 2 December 2004 (2004-12-02) cited in the application
D2: WO 03/080678 A (CHIRON SRL [IT]; COSTANTINO PAOLO [IT]; BERTI FRANCESCO [IT]; NORELLI) 2 October 2003 (2003-10-02)

Article 33(2) PCT

The subject matter of claims 80-92 does not meet the requirements of Article 33(2) PCT.

Document D1 discloses vaccines against *N. meningitidis*. The vaccine preparations of this disclosure are based on polysaccharides from serogroups A, C, W-135 or Y which are conjugated to a protein carrier molecule. The composition may also comprise two or more capsular polysaccharides conjugated to one or more carrier proteins. The polysaccharides have an average size of less than 100,000 daltons. Amongst the other possible sizes of the polysaccharides, the following ranges (in daltons) are mentioned: 5,000 to 75,000 and 7,000 to 50,000 (cf page 6, line 11 to page 7, line 21; page 9, line 4 to page 10, line 2;

examples; claims). In light of D1, claims 80-92 of the present application are not novel (Article 33(2) PCT).

The subject matter of claims 1-79 and 93-106 is therefore novel with regard to the prior art.

Article 33(3) PCT

The subject matter of claims 1-79 and 93-106 is not inventive with regard to the prior art (Article 33(3) PCT).

The use of a linker molecule in the formation of a conjugate would also be obvious to the skilled person (see for example D2, page 14, lines 17-27), as would the incorporation of conjugates of H. influenzae and other pathogen antigens. Ratios of carrier protein to polysaccharide are taught in D1. Furthermore the combination of conjugates having a linker molecule with those where antigens and carriers are directly linked would be an obvious choice to the skilled person. The skilled person would therefore view the subject matter of claims 1-79 and 93-106 as being obvious. Said claims are therefore not inventive (Article 33(3) PCT).

5

10

* * * * *

25

COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA

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,

toxide 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 epítomos 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 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 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 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 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 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 conjugar 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).

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*.

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.

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.

"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 conjugaba con toxoide de tétanos a través de un grupo amina sobre el toxoide de tétanos, y MenC se conjugaba 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.

20 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, 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 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 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. 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 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 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 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.

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-0-477508.

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. 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:

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.

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
conjugua 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 conjugua utilizando CNBr y la
química de carbodimida, opcionalmente EDAC. Por ejemplo, se
utiliza CNBr para unir el sacárido y el enlazante, y luego se utiliza la
20 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
conjugua 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 (α 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 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 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 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 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.

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 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 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 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 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 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 *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 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 (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.

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.

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
 5 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
 10 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.

15 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
 20 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
 25 dimensiona por un factor no mayor de x10. En una modalidad

adicional, los conjugados de *N. meningitidis* se hacen a partir de una mezcla de polisacáridos nativos y sacáridos que se dimensionan por un factor no mayor de x10. En una modalidad adicional, el sacárido capsular del serogrupo Y se dimensiona por un factor no mayor de x10. En una modalidad adicional, los sacáridos capsulares de los serogrupos A y C son polisacáridos nativos, y los sacáridos de los serogrupos W135 e Y se dimensionan por un factor no mayor de x10. En una modalidad adicional, el tamaño promedio de cada sacárido capsular de *N. meningitidis* es de entre 50 kDa y 300 kDa, o de entre 50 kDa y 200 kDa. En una modalidad adicional, la composición inmunogénica comprende un sacárido capsular MenA que tiene un tamaño promedio mayor de 50 kDa, de 75 kDa, de 100 kDa, o un tamaño promedio de entre 50 y 100 kDa, o de entre 55 y 90 kDa, o de entre 60 y 80 kDa. En una modalidad adicional, la composición inmunogénica comprende un sacárido capsular MenC que tiene un tamaño promedio mayor de 50 kDa, de 75 kDa, de 100 kDa, o de entre 100 y 200 kDa, de entre 100 y 150 kDa, de entre 80 a 120 kDa, de entre 90 y 110 kDa, de entre 150 y 200 kDa, de entre 120 y 240 kDa, de entre 140 y 220 kDa, de entre 160 y 200 kDa, o de entre 190 y 200 kDa. En una modalidad adicional, la composición inmunogénica comprende un sacárido capsular MenY que tiene un tamaño promedio mayor de 50 kDa, de 75 kDa, de 100 kDa, o de entre 60 y 190 kDa, o de entre 70 y 180 kDa, o de entre 80 y 170 kDa, o de entre 90 y 160 kDa, o de entre 100 y 150 kDa, o de entre 110 y 145 kDa, o de entre 120 y 140 kDa. En una modalidad adicional, la

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.*
 5 *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
 10 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)
 15 (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
 20 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
 25 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 7 microgramos, 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 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 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 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 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 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

10 sacáridos presentes en una vacuna, éstos se podrían administrar por separado al mismo tiempo, o de una a dos semanas después de la 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

15 emplear dos vías de administración diferentes. Por ejemplo, los antígenos virales se pueden administrar ID (intradérmicamente), mientras que las proteínas bacterianas se pueden administrar IM

(intramuscularmente) o IN (intranasalmente). Si hay sacáridos presentes, se pueden administrar intramuscularmente (o

20 intradérmicamente), y las proteínas bacterianas se pueden administrar intranasalmente (o intradérmicamente). En adición, las 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:

toxóide de tétanos (TT),

toxóide 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).

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
5 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
10 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
15 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)
20 (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
25 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 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 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 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 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 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 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:

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 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 + 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 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.

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

20

25

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

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

25

	Puntos finales	Grupo	N	%	Grupo	N	%	Diferencia	Valor %
		M	85	64.7	N	91	51.6	N-M	-13.1
5	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
10	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
15	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
20	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

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

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

*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.

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.

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

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 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
%≥0.15	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)

5

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

10

Tabla 7d. SBA-MenY (Titulación)

15

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)

20

25

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	SBA-MenA	Grupo	N	%	≥1:8 LL	UL	%	≥1:128 LL	UL	GMT
		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
10	SBA-MenC	Meningitec ^{MR}	41	51.2	35.1	67.1	43.9	28.5	60.3	42.8
		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
15	SBA-MenW	Meningitec ^{MR}	50	94.0	83.5	98.7	62.0	47.2	75.3	200.1
		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
20	SBA-MenY	Meningitec ^{MR}	48	27.1	15.3	41.8	6.3	1.3	17.2	9.4
		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
25	SBA-MenY	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

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
		Meningitec ^{MR}	49	98.0	89.1	99.9	93.9	83.1	98.7	7.95
20	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

	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

5

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 Iyo).

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 $\geq 1/32$ en un mes, ó 2) para los sujetos inicialmente seropositivos - una titulación de anticuerpo ≥ 4 veces la titulación de anticuerpo antes de la vacunación.

20

Resultados

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

25

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.

10

Tabla 12

15

20

25

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

		% de respondentes a SBA MenC	SBA-MenC GMT	Anti-PSC GMC µg/ml ELISA
5		69.6	3989	12.11
		81.8	3524	12.78
		81.8	3608	8.4
		73.9	2391	8.84
10		90.0	5447	38.71
		% de respondentes a SBA MenW	SBA-MenW GMT	Anti-PSW GMC µg/ml ELISA
15		95	5418	9.65
		85	4469	14.55
		95.5	4257	6.39
		95.5	4621	10.7
20		86.4	2714	13.57
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		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
10		Mencevax ^{MR}	78.3	8284	12.93
15		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
20		Mencevax ^{MR}	91.7	1567	16.55
25					

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 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 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 través de un enlazante con una proteína portadora, y los sacáridos capsulares MenC, MenY, y MenW conjugados directamente con proteína(s) portadora(s).

7. 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.

8. 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.

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

10. 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.

5 11. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde 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 (p/p).

10 12. 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.

13. La composición inmunogénica de la reivindicación 12, 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.

15 14. La composición inmunogénica de la reivindicación 12 ó 13, en donde cuando menos uno, dos, o tres conjugados de sacárido de *N. meningitidis* se conjugan directamente mediante la química de CDAP.

20 15. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde la proporción del sacárido MenW y/o Y a la proteína portadora es de entre 1:0.5 y 1:2 (p/p).

16. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en donde la proporción del sacárido MenC a la proteína portadora es de entre 1:0.5 y 1:2 (p/p).

25 17. La composición inmunogénica de cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 16, 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 18. La composición inmunogénica de la reivindicación 17, en donde el enlazante es bifuncional.

19. La composición inmunogénica de la reivindicación 17 ó 18, en donde el enlazante tiene dos grupos amino reactivos.

10 20. La composición inmunogénica de la reivindicación 17 ó 18, en donde el enlazante tiene dos grupos de ácido carboxílico reactivos.

21. La composición inmunogénica de la reivindicación 17 ó 18, en donde el enlazante tiene un grupo amino reactivo en un extremo, y un grupo de ácido carboxílico reactivo en el otro extremo.

15 22. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 17 a 21, en donde el enlazante tiene entre 4 y 12 átomos de carbono.

23. La composición inmunogénica de la reivindicación 17 ó 18, en donde el enlazante es ADH.

20 24. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en donde los o cada sacárido capsular de *N. meningitidis* conjugado por medio de un enlazante, se conjuga con el enlazante con la química de CDAP.

25 25. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 17 a 24, en donde la proteína portadora se conjuga con el enlazante utilizando la química de carbodiimida, opcionalmente utilizando EDAC.

26. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, en donde los o cada sacárido capsular de *N.- meningitidis* se conjuga con el enlazante antes de que se conjugue la proteína portadora con el enlazante.

5 27. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26, en donde MenA se conjuga con una proteína portadora por medio de un enlazante.

28. La composición inmunogénica de la reivindicación 27, en donde la proporción del sacárido MenA a la proteína portadora es de
10 entre 1:2 y 1:5 (peso/peso).

29. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28, en donde MenC se conjuga con una proteína portadora por medio de un enlazante.

30. La composición inmunogénica de la reivindicación 34, en
15 donde la proporción del sacárido MenC a la proteína portadora es de entre 1:2 y 1:5 (p/p).

31. 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
20 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.

32. La composición inmunogénica de la reivindicación 31, en
25 donde cada sacárido de *N. meningitidis* es ya sea un polisacárido

nativo, o bien se dimensiona por un factor no mayor de x10.

33. La composición inmunogénica de la reivindicación 31 ó 32, en donde cada sacárido capsular de *N. meningitidis* es un polisacárido nativo.

5 34. La composición inmunogénica de la reivindicación 31 ó 32, en donde cuando menos uno, dos, tres, o cuatro sacáridos capsulares de *N. meningitidis* se dimensionan mediante microfluidización.

10 35. La composición inmunogénica de la reivindicación 31 ó 32, en donde cada sacárido capsular de *N. meningitidis* se dimensiona por un factor no mayor de x10.

36. La composición inmunogénica de la reivindicación 31 ó 32, en donde los conjugados de *N. meningitidis* se hacen a partir de una mezcla de polisacáridos nativos y sacáridos que se dimensionan
15 por un factor no mayor de x10.

37. La composición inmunogénica de la reivindicación 36, en donde el sacárido capsular a partir del serogrupo Y se dimensiona por un factor no mayor de x10.

20 38. La composición inmunogénica de la reivindicación 36 ó 37, en donde los sacáridos capsulares de los serogrupos A y C son polisacáridos nativos, y los sacáridos a partir de los serogrupos W135 e Y se dimensionan por un factor no mayor de x10.

25 39. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 31 a 38, en donde el tamaño promedio de cada sacárido capsular de *N. meningitidis* es de entre 50 kDa y 300 kDa, o de entre 50 kDa y 200

kDa.

40. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 31 a 39, la cual comprende un sacárido capsular MenA que tiene un tamaño promedio mayor de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, o un tamaño
5 promedio de entre 50 y 100 kDa o de entre 55 y 90 kDa o de entre 60 y 80 kDa.

41. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 31 a 40, la cual comprende un sacárido capsular MenC que tiene un tamaño promedio mayor de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, o de entre 100
10 y 200 kDa, de entre 100 y 150 kDa, de entre 80 y 120 kDa, de entre 90 y 110 kDa, de entre 150 y 200 kDa, de entre 120 y 240 kDa, de entre 140 y 200 kDa, de entre 160 y 200 kDa, o de entre 190 a 200 kDa.

42. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 31 a 41, la cual comprende un sacárido capsular MenY, que tiene un tamaño promedio mayor de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, o de entre 60 y
15 190 kDa, o de entre 70 y 180 kDa, o de entre 80 y 170 kDa, o de entre 90 y 160 kDa, o de entre 100 y 150 kDa, o de entre 110 y 145 kDa, o de entre 120 y 40 kDa.

43. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 31 a 42, la cual comprende un sacárido capsular MenW que tiene un tamaño promedio mayor de 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, o de entre 60 y
20 190 kDa, o de entre 70 y 180 kDa, o 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
25 kDa, o de entre 150 y 170 kDa, o de entre 110 y 140 kDa.

44. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la dosis de cada conjugado de sacárido es de entre 2 y 20 microgramos, de entre 3 y 10 microgramos, o de entre 4 y 7 microgramos del sacárido.

5 45. 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.

10 46. La composición inmunogénica de la reivindicación 45, en donde el sacárido capsular de *H. influenzae* b se conjuga con una proteína portadora seleccionada a partir del grupo que consiste en TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, y proteína D.

15 47. La composición inmunogénica de la reivindicación 45 ó 46, en donde el sacárido de Hib se conjuga con la misma proteína portadora que para cuando menos uno, dos, tres, o todos los conjugados de sacáridos capsulares de *N. meningitidis*.

48. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 45 a 47, en donde el sacárido de Hib se conjuga con TT.

20 49. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 45 a 48, en donde la proporción de Hib a la proteína portadora en el conjugado de sacárido capsular de Hib, es de entre 1:5 y 5:1 (p/p).

25 50. La composición inmunogénica de la reivindicación 49, en donde la proporción de Hib a la proteína portadora en el conjugado de sacárido capsular de Hib es de entre 1:1 y 1:4, de entre 1:2 y 1:3.5, o de alrededor de 1:3 (p/p).

51. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 45 a 50, en donde el sacárido capsular de Hib se conjuga con la proteína portadora por medio de un enlazante.

52. La composición inmunogénica de la reivindicación 51, en
5 donde el enlazante es bifuncional.

53. La composición inmunogénica de la reivindicación 51 ó 52, en donde el enlazante tiene dos grupos amino reactivos.

54. La composición inmunogénica de la reivindicación 51 ó 52, en donde el enlazante tiene dos grupos de ácido carboxílico
10 reactivos.

55. La composición inmunogénica de la reivindicación 51 ó 52, en donde el enlazante tiene un grupo amino reactivo en un extremo, y un grupo de ácido carboxílico reactivo en el otro extremo.

56. La composición inmunogénica de cualquiera de las
15 reivindicaciones 51 a 55, en donde el enlazante tiene entre 4 y 12 átomos de carbono.

57. La composición inmunogénica de la reivindicación 51 ó 52, en donde el enlazante es ADH.

58. La composición inmunogénica de cualquiera de las
20 reivindicaciones 55 a 57, en donde el sacárido de Hib se conjuga con la proteína portadora o el enlazante utilizando CNBr ó CDAP.

59. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 51 a 58, en donde la proteína portadora se conjuga con el sacárido de Hib por medio del enlazante, empleando un método que comprende la
25 química de carbodiimida, opcionalmente la química de EDAC.

60. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 45 a 59, 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
5 en una dosis más baja que la dosis promedio de los cuando menos dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales.

61. La composición inmunogénica de la reivindicación 60, en donde el conjugado de Hib está presente en una dosis más baja que la dosis de cada uno de los cuando menos dos conjugados de
10 sacáridos bacterianos adicionales.

62. La composición inmunogénica de la reivindicación 60 ó 61, en donde los cuando menos dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales comprenden el conjugado de sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* (MenC).

63. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 60 a 62, en donde los cuando menos dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales comprenden el conjugado de sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis* (MenY).
15

64. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 60 a 63, en donde los cuando menos dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales comprenden el conjugado de sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis* (MenA).
20

65. La composición inmunogénica de cualquiera de las
25

reivindicaciones 60 a 64, en donde los cuando menos dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales comprenden al conjugado de sacárido capsular del serogrupo W135 de *N. meningitidis* (MenW).

5 66. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 60 a 65, en donde los cuando menos dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales comprenden un sacárido capsular de *S. pneumoniae* derivado a partir de una cepa seleccionada a partir del grupo que consiste en los serotipos 1, 2, 3,
10 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, y 33F.

 67. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 60 a 66, en donde los cuando menos dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales comprenden un
15 sacárido capsular de Vi de *S. typhi*.

 68. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 60 a 67, en donde la dosis del conjugado de sacárido de Hib es de entre 0.1 y 9 microgramos, de entre 1 y 5 microgramos, o de entre 2 y 3 microgramos del sacárido.

20 69. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 60 a 68, en donde la dosis de cada uno de los cuando menos dos conjugados de sacáridos adicionales es de entre 2 y 20 microgramos, de entre 3 y 10 microgramos, o de entre 4 y 7 microgramos de sacárido.

25 70. La composición inmunogénica de cualquiera de las

reivindicaciones 60 a 69, en donde la dosis de sacárido del conjugado de sacárido de Hib es menor del 90 por ciento, del 75 por ciento, o del 60 por ciento, de entre el 20 por ciento y el 60 por ciento, o de alrededor del 50 por ciento de la dosis de sacárido promedio de los cuando menos dos conjugados de sacáridos adicionales.

71. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 60 a 70, en donde la dosis de sacárido del conjugado de sacárido de Hib es menor del 90 por ciento, del 75 por ciento, o del 60 por ciento, o es de entre el 20 y el 60 por ciento, o es de alrededor del 50 por ciento de la dosis de sacárido de cada uno de los cuando menos dos conjugados de sacáridos adicionales.

72. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 60 a 71, en donde se utiliza la misma proteína portadora en el conjugado de Hib y dos o más de los cuando menos dos conjugados de sacáridos bacterianos adicionales.

73. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, la cual comprende una preparación de vesícula de membrana externa o sacárido capsular del serogrupo B de *N. meningitidis*.

74. Una vacuna, la cual comprende la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 73, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

75. 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
 5 comprende:

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

10 la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 73.

76. Un proceso para la elaboración de la vacuna de la reivindicación 74, el cual comprende el paso de mezclar la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a
 15 73, con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

77. Un método para inmunizar a un hospedero humano contra una enfermedad causada por infección por *Neisseria meningitidis*, el cual comprende administrar al hospedero una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica o vacuna de las reivindicaciones 1 a
 20 75.

78. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1 a 73, para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de una enfermedad causada por infección por *Neisseria meningitidis*.

79. El uso de la composición inmunogénica de cualquiera de
 25 las reivindicaciones 1 a 73, en la fabricación de un medicamento

para el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por infección por *Neisseria meningitidis*.

80. Una composición inmunogénica, la cual comprende 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 portadora por medio de un segundo tipo de grupo químico sobre la proteína portadora.

81. La composición inmunogénica de la reivindicación 80, 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.

82. Una composición inmunogénica de la reivindicación 80 u 81, 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.

83. Una composición inmunogénica de las reivindicaciones 80 a 82, 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.

84. Una composición inmunogénica de las reivindicaciones 80 a 83, 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.

85. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 80 a 84, en donde la proteína portadora se selecciona a partir del grupo que consiste en: TT, DT, CRM197, fragmento C de TT, y proteína D.

86. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 80 a 84, en donde la proteína portadora es TT.

87. Una composición inmunogénica de las reivindicaciones 80 a 86, 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 con la proteína portadora por medio del primer tipo de grupo químico sobre la proteína portadora, y uno o más sacáridos
5 diferentes se seleccionan a partir de un segundo grupo que consiste en MenC, MenY, y MenW, los cuales se conjugan con la proteína portadora por medio del segundo tipo de grupo químico sobre la proteína portadora.

88. Una composición inmunogénica de la reivindicación 87, en
10 donde el primer tipo de grupo químico es un grupo carboxilo sobre la proteína portadora, y el segundo tipo de grupo químico es un grupo amino sobre la proteína portadora.

89. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 87 a 88, la cual comprende MenA conjugado por medio del primer tipo de
15 grupo químico, y MenC conjugado por medio del segundo tipo de grupo químico.

90. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 87 a 88, la cual comprende MenC conjugado por medio del primer tipo de grupo químico, y MenY conjugado por medio del segundo tipo de
20 grupo químico.

91. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 87 a 88, la cual comprende MenA conjugado por medio del primer tipo de grupo químico, y MenC, MenY, y MenW conjugados por medio del
segundo tipo de grupo químico.

25 92. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 87 a

88, la cual comprende MenA y MenC conjugados por medio del primer tipo de grupo químico, y MenY y MenW conjugados por el segundo tipo de grupo químico.

5 93. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 87 a 92, la cual comprende además un sacárido capsular a partir de *H. influenzae* tipo b (Hib) conjugado con una proteína portadora.

94. La composición inmunogénica de la reivindicación 93, en donde Hib se conjuga con el mismo tipo de proteína portadora que los sacáridos de *N. meningitidis*.

10 95. La composición inmunogénica de la reivindicación 94, en donde Hib se conjuga con la proteína portadora por medio del primero o del segundo tipo de grupo químico.

15 96. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 80 a 95, en donde los sacáridos conjugados por medio del primer tipo de grupo químico lo hacen a través de un enlazante, y los sacáridos conjugados por medio del segundo tipo de grupo químico lo hacen directamente, o en donde los sacáridos conjugados por medio del segundo tipo de grupo químico lo hacen a través de un enlazante, y los sacáridos conjugados por medio del primer tipo de grupo químico
20 lo hacen directamente.

97. La composición inmunogénica de la reivindicación 96, en donde el enlazante es bifuncional.

98. La composición inmunogénica de la reivindicación 96 ó 97, en donde el enlazante tiene entre 4 y 12 átomos de carbono.

25 99. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 96 a

98, en donde el enlazante tiene dos grupos amino reactivos.

100. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 96 a 98, en donde el enlazante tiene dos grupos de ácido carboxílico reactivos.

5 101. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 96 a 98, en donde el enlazante tiene un grupo amino reactivo en un extremo, y un grupo de ácido carboxílico en el otro extremo.

102. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 96 a 98, en donde el enlazante es ADH.

10 103. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 96 a 102, en donde los o cada sacárido capsular conjugado por medio de un enlazante se conjuga con el enlazante con la química de CDAP.

104. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 96 a 103, en donde la proteína portadora se conjuga con el enlazante
15 utilizando la química de carbodiimida, opcionalmente utilizando EDAC.

105. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 96 a 104, en donde los o cada sacárido capsular se conjuga con el enlazante antes de que se conjugue la proteína portadora con el
20 enlazante, o el enlazante se conjuga con el sacárido antes de que se conjugue con la proteína portadora.

106. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 96 a 105, la cual es una composición inmunogénica de las reivindicaciones 1 a 74.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference CLJ/VB61473	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA416
International application No. PCT/EP2006/006269	International filing date (day/month/year) 23.06.2006	Priority date (day/month/year) 27.06.2005	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K39/095			
Applicant GlaxoSmithKline Biologicals s.a.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 2007-05-16		Date of completion of this report 14.11.2007	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Rankin, Robert Telephone No. +49 89 2399-2659 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2006/006269

Box No. I Basis of the report

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

Description, Pages

1-50 as originally filed

Claims, Numbers

1-106 as originally filed

Drawings, Sheets

1/1 as originally filed

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

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

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2006/006269

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

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

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 77 (for reasons of industrial applicability)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 77 (for reasons of industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*).
- ☐ no international search report has been established for the said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2006/006269

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-106</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-106</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-106</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Re Item III

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

Claim 77 relates to subject matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject matter of this claim (Article 34(4)(a)(i) PCT)

Re Item V

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

For the assessment of the present claim 77 on the question whether it is industrially applicable, no unified criteria exist within the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as industrially applicable the subject matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Cited Documents

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 2004/103400 A (AVENTIS PASTEUR INC [US]; RYALL ROBERT P [US]) 2 December 2004 (2004-12-02)
D2: WO 03/080678 A (CHIRON SRL [IT]; COSTANTINO PAOLO [IT]; BERTI FRANCESCO [IT]; NORELLI) 2 October 2003 (2003-10-02)

Article 33(2) PCT

The subject matter of claims 1-106 are considered novel.

Document D1 discloses vaccines against *N. meningitidis*. The vaccine preparations of this disclosure are based on polysaccharides from serogroups A, C, W-135 or Y which are conjugated to a protein carrier molecule. The composition may also comprise two or more capsular polysaccharides conjugated to one or more carrier proteins. The polysaccharides have an average size of less than 100,000 daltons. Amongst the other possible sizes of the polysaccharides, the following ranges (in daltons) are mentioned: 5,000 to 75,000 and 7,000 to 50,000 (cf page 6, line 11 to page 7, line 21; page 9, line 4 to page 10, line 2;

examples; claims).

The vaccines of D1 are not conjugated using different types of conjugation methods to the carrier protein.

Article 33(3) PCT

For claim 1, D1 represents the closest prior art, however D1 does not disclose compositions where an antigen is conjugated to a carrier directly and a second via a linker.

The effect arising from this difference is that immune responses against the conjugated antigens may be optimised.

The problem to be solved may be therefore considered as being to provide an improved N.meningitidis conjugated polysaccharide vaccine.

The subject matter of claim 1 solves this problem (see examples 8 and 9) and is considered inventive because the skilled person would not have viewed the solution as being obvious as D1 employs a linker for all conjugations. The subject matter of claim 1 is therefore inventive (Article 33(3) PCT). Claims 2-79 are consequently also inventive.

For claim 80, D1 is also the closest prior art. Claim 80 differs from D1 in that the polysaccharides are conjugated to the carrier protein via different chemical groups.

The technical effect of the difference is that the antigens can be bound to the carrier in a way which optimises their immunological recognition by the recipient.

The problem to be solved may therefore be considered as being to provide an improved N.meningitidis conjugated polysaccharide vaccine.

The subject matter of claim 80 solves this problem (see examples 8 and 9) and is considered inventive because the skilled person would not have viewed the solution as being obvious as D1 and D2 do not disclose or suggest employing different means of binding the antigens to the same carrier. The subject matter of claim 80 is therefore

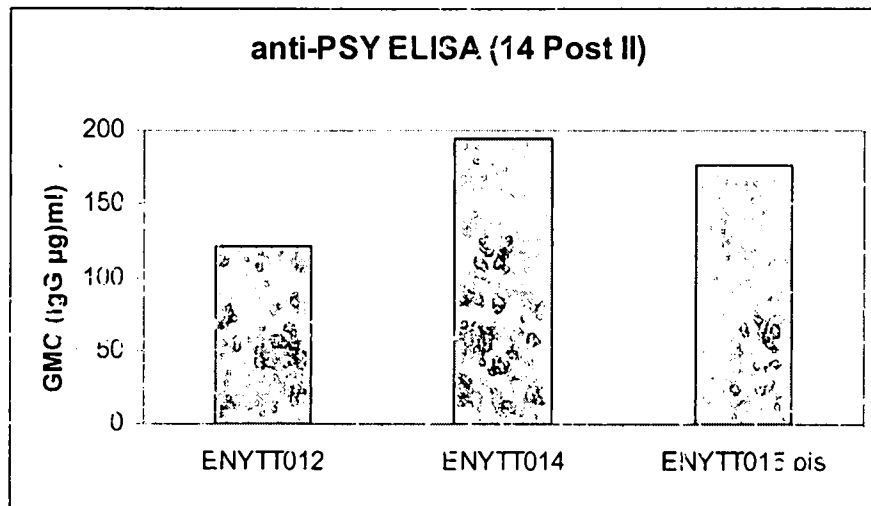
**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2006/006269

inventive (Article 33(3) PCT). Claims 81-106 are consequently also inventive.

A



B

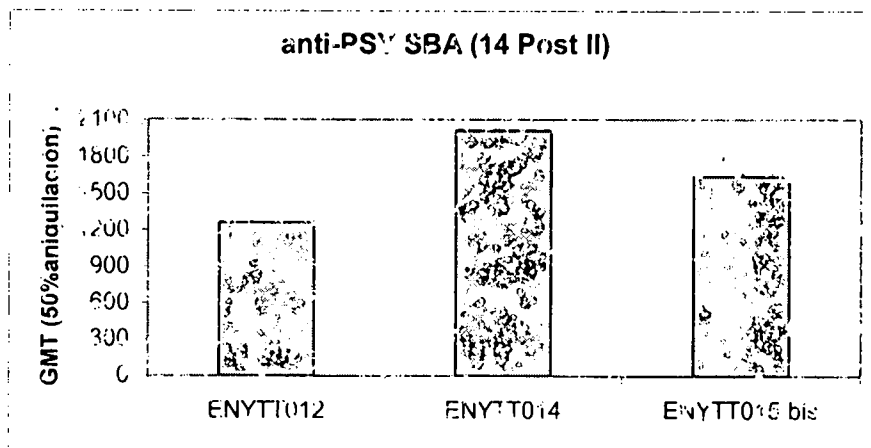


FIG. 1

