



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



1292
RST

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

09-23294

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO : **"VACUNA"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A61K 39/13**

71. SOLICITANTE **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

DOMICILIO: **RIXENSART, BÉLGICA.**

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

22. BOGOTÁ, D.C.

- 6 MAR 2009

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-023294-00000-0000

Fecha: 2009-03-06 15:41:36 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 193

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

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

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

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart,
Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

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

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: **DE HEMPTINNE, Hervé, DUCHENE, Michel; MARY, Anne y
SONVEAUX, Marc.**

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

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2007/059391

Fecha: 07/09/07

Publicación Internacional No. WO 2008/028957 A3

Fecha: 13/03/08

⑥

Título (54) **"VACUNA"**

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/13

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB
GB

(32) Fecha

07/09/06
21/12/06

(31) Número de Solicitud

0617602.8
0625593.9

⑨

Comprobante de Pago No. 09-17,027

Fecha: Marzo 3 de 2009

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documentos que acreditan la existencia y representación legal cuando los solicitantes sean personas jurídicas.
- ☒ Documentos 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)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Publicación, Opinión Escrita, Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad, la Traducción de sus anexos y Dibujos .

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-023294- -00000-0000

Fecha: 2009-03-06 15:41:36 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 193

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 17,027
FECHA : MARZO 3 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORED A Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	97134951	03/03/2009	14,564,760.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
	TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

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


ALICIA LLOREDA RICAURTE
T. P. 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)

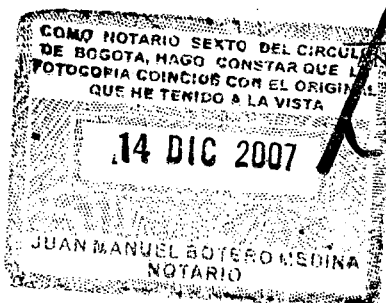
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

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



LITA ESCOBAR DE TAMAYO

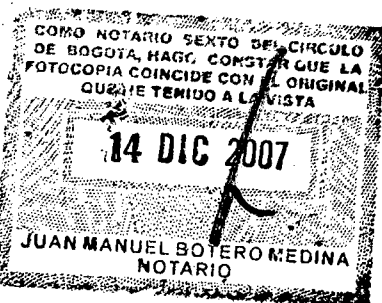
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

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



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

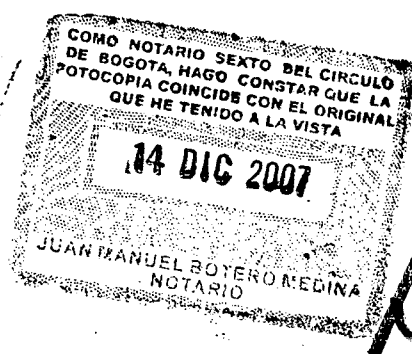
W. Glass
Por el Secretario de Estado

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

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

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



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

C E R T I F I C O:

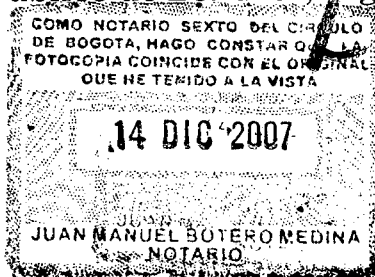
QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada "**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**" (anteriormente denominada "**Smithkline Beecham Biologicals s.a.**"),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

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

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

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

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

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

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

This public document/Le présent acte public

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

Certified/Attesté

5. at London/à Londres 6. the/le 01 SEP 2004
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

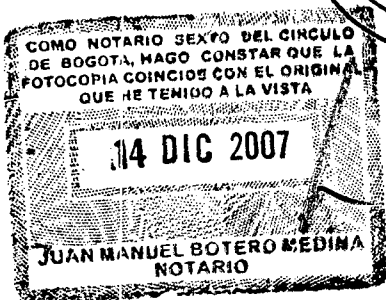
9. Stamp:
timbre:



10. Signature:

WGLASS

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



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

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

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

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

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

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

Dado y firmado

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

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

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

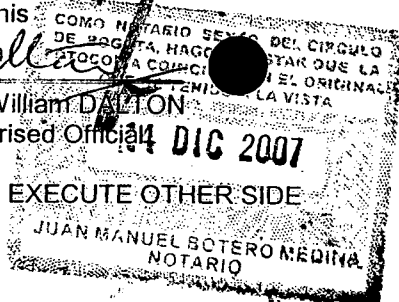
Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property,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

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

31 AUG 2004

Given and signed this

Marcus Jonathan William Dalton
Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official



NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de **Bélgica**, domiciliada en la ciudad de **Rixensart, Bélgica**, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad. El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en , con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

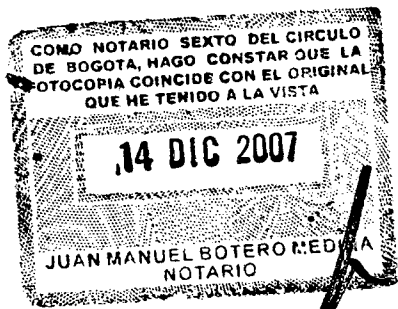
Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

On this day of , 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the **Belgium**, domiciled at the City of **Rixensart, Belgium**, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of , that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company. The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at , under date of , and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.



(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl: A61K 39/13	
(22) Fecha de solicitud: 06-03-09				(71) Solicitante(s) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es) DE HEMPTINNE, Hervé, DUCHENE, Michel ; MARY, Anne y SONVEAUX, Marc.	
	0617602.8	07-09-06	GB		
	0625593.9	21-12-06	GB		
				(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 07-04-09				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 13/03/08	
Fecha de presentación de la solicitud: 07/09/07				N° publicación: WO 2008/028957 A3	
No. de solicitud PCT/EP2007/059391					
(54) Título: VACUNA					

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 8:

Un método para la elaboración de una vacuna (es decir, una vacuna de combinación) que comprende el poliovirus inactivado tipo 1, el cual comprende los pasos de: mezclar toxoide de difteria y toxoide de tétanos, seguidos por la adición del poliovirus inactivado tipo 1 en una dosis mayor de 10 unidades de antígeno D y menos de 20 unidades de antígeno D, y opcionalmente los poliovirus inactivados tipos 2 y/o 3 (IPV).



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION ____ **PCT** X **MODELO DE UTILIDAD** ____ **DISEÑO INDUSTRIAL** ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 06/03/09

(51) Clasificación Internacional : A61K 39/13

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

(72) Inventor(es) DE HEMPTINNE, Hervé, DUCHENE, Michel; MARY, Anne y SONVEAUX, Marc.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	32) Fecha	(33) País
	0617602.8	07-09-06	GB
	0625593.9	21-12-06	GB

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 07-04-09

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **07/09/07**

No. de solicitud **PCT/EP2007/059391**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **13/03/08**

No. Publicación : **WO 2008/028957 A3**

(54) Titulo: **"VACUNA"**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION

PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD

DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 06/03/09

(51) Clasificación Internacional : A61K 39/13

(71) Solicitante(s) **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**(72) Inventor(es) **DE HEMPTINNE, Hervé, DUCHENE, Michel; MARY, Anne y SONVEAUX, Marc.**(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad

(31)

No. Prioridad

(32)

Fecha

(33)

País

0617602.8

07-09-06

GB

0625593.9

21-12-06

GB

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 07-04-09

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 07/09/07

No. De solicitud **PCT/EP2007/059391**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **13/03/08**No. Publicación : **WO 2008/028957 A3**(54) Título: **"VACUNA"**

(57) Resumen:

Reivindicación número 1:

Un método para la elaboración de una vacuna (es decir, una vacuna de combinación) que comprende el poliovirus inactivado tipo 1, el cual comprende los pasos de: mezclar toxoide de difteria y toxoide de tétanos, seguidos por la adición del poliovirus inactivado tipo 1 en una dosis mayor de 10 unidades de antígeno D y menos de 20 unidades de antígeno D, y opcionalmente los poliovirus inactivados tipos 2 y/o 3 (IPV).

FIGURA CARACTERISTICA

6 x 6 cm

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To: GLAXOSMITHKLINE Attn: Lubinski, Michael John Corporate International Property (CN925.1) 980 Great West Road Brentford, Middlesex TW8 9GS GRANDE BRETAGNE		NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION	
GlaxoSmithKline Corporate IP Received BREITFORD - 9 MAY 2008			
ATTY: EB ADMIN: W		(PCT Rule 44.1)	
IPM: N/A ON UPDATED		Date of mailing 9/5 (day/month/year)	
ATTY CHECKED/FILE		08/05/2008 ✓	
Applicant's or agent's file reference EKB/VB626215 VB62615		FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below	
International application No. PCT/EP2007/059391		International filing date (day/month/year) 07/09/2007	
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:
 The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  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 Michela Digiusto
--	--

Form PCT/ISA/220 (October 2005)

(See notes on accompanying sheet)

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference EKB/VB626215	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2007/059391	International filing date (day/month/year) 07/09/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 07/09/2006
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 4 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. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ 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/EP2007/059391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/13

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

B. FIELDS SEARCHEDMinimum 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	HERREMANS T.M.P.T. ET AL.: "Induction of mucosal immunity by inactivated poliovirus vaccine is dependent on previous mucosal contact with live virus." J. IMMUNOL., vol. 162, 1999, pages 511-5018, XP002463164 the whole document	1-87
X	DOI Y ET AL: "PROGRESS WITH INACTIVATED POLIOVIRUS VACCINES DERIVED FROM THE SABIN STRAINS" DEVELOPMENTS IN BIOLOGICALS, KARGER, BASEL, CH, vol. 105, 2001, pages 163-169, XP009040789 ISSN: 1424-6074 figure 3 ----- -/-	1-87

☒ 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.

- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search.

8 February 2008

Date of mailing of the international search report

08/05/2008

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/EP2007/059391

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DRAGUNSKY E M ET AL: "EVALUATION OF IMMUNOGENICITY AND PROTECTIVE PROPERTIES OF INACTIVATED POLIOVIRUS VACCINES: A NEW SURROGATE METHOD FOR PREDICTING VACCINE EFFICACY" JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, CHICAGO, IL, US, vol. 190, no. 8, 15 October 2004 (2004-10-15), pages 1404-1412, XP009040799 ISSN: 0022-1899 figure 3; table 2 -----	1-87
X	WO 98/00167 A (CONNAUGHT LAB [CA]; FAHIM RAAFAT E F [CA]; TAN LARRY U L [CA]; BARRETO) 8 January 1998 (1998-01-08) claim 10 -----	1-87
A	WO 2004/039399 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; MAYERESSE YVES [BE]; STEPHENNE JEAN [B]) 13 May 2004 (2004-05-13) page 24, line 1 - line 9 -----	1-87
A	SCHMITT H J ET AL: "PRIMARY VACCINATION OF INFANTS WITH DIPHTHERIA-TETANUS-ACELLULAR PERTUSSIS-HEPATITIS B VIRUS- INACTIVATED POLIO VIRUS AND HAEMOPHILUS INFLUENYAE TYPE B VACCINES GIVEN AS EITHER SEPARATE OR MIXED INJECTIONS" JOURNAL OF PEDIATRICS, MOSBY-YEAR BOOK, ST. LOUIS, MO, US, vol. 137, no. 3, September 2000 (2000-09), pages 304-312, XP009023955 ISSN: 0022-3476 the whole document -----	1-87

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/059391

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9800167 A	08-01-1998	AT 339965 T	15-10-2006
		AU 714493 B2	06-01-2000
		AU 3251697 A	21-01-1998
		BR 9710460 A	17-08-1999
		CA 2259415 A1	08-01-1998
		CN 1228709 A	15-09-1999
		DE 69736709 T2	04-10-2007
		DK 0914153 T3	29-01-2007
		EP 0914153 A1	12-05-1999
		ES 2271969 T3	16-04-2007
		IL 127847 A	01-06-2004
		JP 2000504032 T	04-04-2000
		JP 3280675 B2	13-05-2002
		JP 2002069002 A	08-03-2002
		JP 2006241171 A	14-09-2006
		NZ 333989 A	23-06-2000
		PL 331007 A1	21-06-1999
		RO 120819 B1	30-08-2006
		RU 2194531 C2	20-12-2002
		SI 9720050 A	31-12-1999
		SK 181898 A3	16-05-2000
		TR 9802783 T2	22-03-1999
WO 2004039399 A	13-05-2004	AT 352316 T	15-02-2007
		AU 2003278166 A1	25-05-2004
		AU 2003287980 A1	25-05-2004
		BR 0315767 A	06-09-2005
		CA 2503871 A1	13-05-2004
		CA 2503946 A1	13-05-2004
		DE 60311526 T2	31-10-2007
		WO 2004039417 A2	13-05-2004
		EP 1575612 A1	21-09-2005
		EP 1556477 A2	27-07-2005
		HK 1085380 A1	30-11-2007
		IS 7805 A	18-04-2005
		IS 7806 A	18-04-2005
		JP 2006512406 T	13-04-2006
		JP 2006504801 T	09-02-2006
		KR 20050075766 A	21-07-2005
		KR 20050084626 A	26-08-2005
		MA 27551 A1	03-10-2005
		MA 27644 A1	01-12-2005
		MX PA05004528 A	26-07-2005
		MX PA05004675 A	08-06-2005
		US 2006127415 A1	15-06-2006
		US 2006127414 A1	15-06-2006

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 March 2008 (13.03.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/028957 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/13 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2007/059391

(22) International Filing Date:
7 September 2007 (07.09.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0617602.8 7 September 2006 (07.09.2006) GB
0625593.9 21 December 2006 (21.12.2006) GB

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DE HEMPTINNE, Hervé** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **DUCHENE, Michel** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **MARY, Anne** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **SONVEAUX, Marc** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agents: **LUBIENSKI, Michael, John** et al.; Glaxo-SmithKline, Corporate Intellectual Property CN925.1, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, 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, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

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

Published:

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

(88) Date of publication of the international search report:
3 July 2008

(54) Title: VACCINE

(57) Abstract: The present invention relates to the field of vaccines for protecting against polio, and in particular to combination vaccines for protecting against polio, diphtheria, tetanus, and pertussis diseases. Specifically, vaccines comprising reduced dose inactivated poliovirus (IPV) is provided, which can maintain an adequate or improved level of protection against polio.

WO 2008/028957 A3

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/EP2007/059391

International filing date (day/month/year)
07.09.2007

Priority date (day/month/year)
07.09.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/13

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/EP2007/059391

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. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. 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.
4. ☐ 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.
5. Additional comments:

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>1-87</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-87</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-87</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item V

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

Cited Documents

Reference is made to the following documents:

- D1: HERREMANS T.M.P.T. ET AL.: "Induction of mucosal immunity by inactivated poliovirus vaccine is dependent on previous mucosal contact with live virus." J. IMMUNOL., vol. 162, 1999, pages 511-5018, XP002463164
- D2: DOI Y ET AL: "PROGRESS WITH INACTIVATED POLIOVIRUS VACCINES DERIVED FROM THE SABIN STRAINS" DEVELOPMENTS IN BIOLOGICALS, KARGER, BASEL, CH, vol. 105, 2001, pages 163-169, XP009040789 ISSN: 1424-6074
- D3: DRAGUNSKY E M ET AL: "EVALUATION OF IMMUNOGENICITY AND PROTECTIVE PROPERTIES OF INACTIVATED POLIOVIRUS VACCINES: A NEW SURROGATE METHOD FOR PREDICTING VACCINE EFFICACY" JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, CHICAGO, IL, US, vol. 190, no. 8, 15 October 2004 (2004-10-15), pages 1404-1412, XP009040799 ISSN: 0022-1899
- D4: WO 98/00167 A (CONNAUGHT LAB [CA]; FAHIM RAAFAT E F [CA]; TAN LARRY U L [CA]; BARRETO) 8 January 1998 (1998-01-08)

Article 33(2) PCT

The subject matter of the claims is considered to be novel in light of the prior art.

Article 33(3) PCT

The subject matter of claims 1-87 are not considered inventive (Article 33(3) PCT)

For claim 1

The closest prior art is D1 which discloses combination vaccines containing three IPV serotypes, diphtheria and tetanus antigens. Serotypes 1, 2 and 3 of polio are represented in the vaccine at 40, 4 and 7.5 D-antigen units respectively.

The differences between the subject matter of claim 1 and D1 is that in claim 1, the

serotype 1 polio virus is present at between 10 and 20 D units. Also, in the combination vaccine of claim 1, the antigens are mixed in a certain order.

The technical effect arising from the antigen concentration difference is that less antigen is used to generate immune responses. There is no apparent effect arising from formulating the vaccine antigens in a certain order.

The problem to be solved may therefore be considered as being to provide a combination vaccine comprising polio and other antigens whereby the polio type 1 virus is at a lowered concentration.

The subject matter of claim 1 solves this problem but is not considered inventive because the subject matter of D2 shows that effective immune responses against type 1 polio virus can be achieved with antigen concentrations of 11 D units (see figure 3, top graph). Hence the skilled person would view it as obvious to use a lower polio antigen concentration falling within the claimed range. Claim 1 is therefore not inventive.

For claim 24

The closest prior art is D1, which is described above.

The difference between claim 24 and the subject matter of D1 is that in claim 24, the antigens are mixed in a certain order.

There does not appear to be a technical effect arising from this difference.

The problem to be solved may therefore be considered as being to provide an alternate method of making an IPV multivalent vaccine.

The subject matter of claim 24 solves this problem but is not considered to be inventive because the mere optimisation of a vaccine composition by altering the procedure of adding components would be an obvious option to the skilled person. Hence claim 24 is not inventive.

Furthermore:

D3 shows that a type 2 virus concentration of 1 or 4 D units may be used in a vaccine (see figure 3 & table 2).

D4 shows that a type 3 virus may be used at a concentration of 20-50 D units in a vaccine (see claim 10)

Hence, the use of "reduced" antigen concentrations of the three polio types in vaccines is well known in the art and the skilled person would view it as obvious to use a lower amount than is currently used in some commercial vaccines. For this reason and the reasons stated above, the subject matter of independent claims 1, 2, ~~9~~, ~~10~~ and ~~24~~ ^{deleted} are not inventive (Article 33(3) PCT).

The dependent claims do not appear to have any feature which would render a new independent claim incentive. Hence claims 1-87 are not considered to be inventive (Article 33(3) PCT).

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information

For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.

Amending claims under Art. 19 PCT

Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.

Filing a demand for international preliminary examination

In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT).

If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).

Filing informal comments

After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.

End of the international phase

At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).

Relevant PCT Rules and more information

Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

XS

CPRTENFRDE

**TRADUCCIÓN DE LOS ANEXOS
AL REPORTE PRELIMINAR
INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD**

REIVINDICACIONES

1. Un método para la elaboración de una vacuna (es decir, una vacuna de combinación) que comprende el poliovirus inactivado tipo 1, el cual comprende los pasos de: mezclar toxoide de difteria y toxoide de tétanos, seguidos por la adición del poliovirus inactivado tipo 1 en una dosis mayor de 10 unidades de antígeno D y menos de 20 unidades de antígeno D, y opcionalmente los poliovirus inactivados tipos 2 y/o 3 (IPV).

2. El método de la reivindicación 1, en donde la vacuna comprende el poliovirus inactivado tipo 1 en del 26 al 49 por ciento, del 30 al 45 por ciento, del 33 al 40 por ciento, o del 35 al 37 por ciento de una dosis estándar de 40 unidades de antígeno D.

3. El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la vacuna comprende adicionalmente el poliovirus inactivado tipo 3 en una dosis de 8 a 20 unidades de antígeno D, de 9 a 19 unidades de antígeno D, de 10 a 18 unidades de antígeno D, de 11 a 17 unidades de antígeno D, de 12 a 16 unidades de antígeno D, o de 13 a 15 unidades de antígeno D; por ejemplo de alrededor o exactamente 14 unidades de antígeno D.

4. El método de la reivindicación 3, en donde la vacuna comprende el poliovirus inactivado tipo 3 en una dosis mayor de 8 y menor de 20 unidades de antígeno D.

5. El método de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la vacuna comprende adicionalmente el poliovirus inactivado tipo 2 en

una dosis de 2 a 4 unidades de antígeno D.

5 6. El método de la reivindicación 5, en donde la vacuna comprende el poliovirus inactivado tipo 2 en una dosis de 2 a 20 unidades de antígeno D y menor de 4 unidades de antígeno D, o en una dosis de alrededor o exactamente 3 unidades de antígeno D.

7. El método de las reivindicaciones 1 a 6, el cual comprende el paso subsiguiente de ajustar el pH a 6.5 ± 0.5 , o a un pH de 5.9 a 7.2, o a un pH de 6 a 7, o a un pH de 6.2 a 6.8, o a un pH de 6.4 a 6.6.

10 8. El método de las reivindicaciones 1 a 7, el cual comprende los pasos subsiguientes de agregar un componente de tosferina de células enteras muertas o acelular, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en donde está presente el fosfato de aluminio libre antes de la adición de los antígenos.

15 9. El método de las reivindicaciones 1 a 8, el cual comprende el paso adicional de agregar el antígeno superficial de Hepatitis B antes del ajuste del pH o antes de la adición del poliovirus inactivado.

20 10. El método de las reivindicaciones 1 a 9, el cual comprende el paso adicional de mezclar uno o más antígenos a partir de un patógeno seleccionado de una lista que consiste en: *Haemophillus influenzae* b, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Neisseria meningitidis* tipo B, *Salmonella typhi*, y hepatitis A, con toxoide de difteria, toxoide de tétanos, poliovirus

25

inactivados tipos 1, 2, y/o 3, y opcionalmente el antígeno superficial de Hepatitis B, antes del ajuste del pH.

5 11. El método de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la vacuna comprende poliovirus inactivado tipo 1 adsorbido sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado, o en donde la adsorción tiene lugar después de mezclar con el antígeno diferente del poliovirus inactivado).

10 12. El método de la reivindicación 11, en donde el poliovirus inactivado tipo 1 se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

15 13. El método de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la vacuna comprende poliovirus inactivado tipo 2 adsorbido sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado, o bien en donde la adsorción tiene lugar después de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado).

20 14. El método de la reivindicación 13, en donde el poliovirus inactivado tipo 2 se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

25 15. El método de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la vacuna comprende poliovirus inactivado tipo 3 adsorbido sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o sobre una

mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado, o bien en donde la adsorción tiene lugar después de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado).

5 16. El método de la reivindicación 15, en donde el poliovirus inactivado tipo 3 se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

10 17. El método de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la vacuna comprende poliovirus inactivados tipos 1, 2, y 3, adsorbidos sobre una sal de aluminio (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes de mezclarse con el antígeno diferente del poliovirus inactivado, o bien en donde la adsorción tiene lugar después de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado).

15 18. El método de las reivindicaciones a 1 a 17, en donde la vacuna comprende poliovirus inactivados tipos 1, 2, y 3 adsorbidos sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado, o bien en donde la adsorción tiene lugar después de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado).

20 19. El método de las reivindicaciones 1 a 18, en donde la vacuna comprende toxoide de difteria, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o
25 después de la mezcla con los otros antígenos).

20. El método de la reivindicación 19, en donde el toxoide de difteria se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

5 21. El método de las reivindicaciones 1 a 20, en donde la vacuna comprende toxoide de tétanos, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

10 22. El método de la reivindicación 21, en donde el toxoide de difteria se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

15 23. El método de las reivindicaciones 1 a 22, en donde la vacuna comprende *Bordetella pertussis* de células enteras muertas (Pw), opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

24. El método de la reivindicación 23, en donde el Pw se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

20 25. El método de la reivindicación 24, en donde el *Bordetella pertussis* de células enteras muertas se adsorbe sobre fosfato de aluminio (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

25 26. El método de la reivindicación 24, en donde el Pw se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

27. El método de las reivindicaciones 1 a 22, en donde la vacuna comprende dos o más componentes de tosferina acelulares (Pa) (por ejemplo, toxoide de tosferina (PT), hemagglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN)), opcionalmente adsorbidos sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los antígenos diferentes de los antígenos de tosferina acelulares).

28. El método de la reivindicación 27, en donde el Pa se agrega después del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

29. El método de la reivindicación 28, en donde los dos o más componentes de tosferina acelulares (Pa) se adsorben sobre fosfato de aluminio (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los antígenos diferentes de los antígenos de tosferina acelulares).

30. El método de la reivindicación 29, en donde el Pa se agrega después del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

31. El método de las reivindicaciones 1 a 30, en donde la vacuna comprende antígeno superficial de Hepatitis B, opcionalmente adsorbido sobre fosfato de aluminio (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

32. El método de la reivindicación 31, en donde el antígeno superficial de Hepatitis B se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

33. El método de las reivindicaciones 1 a 32, en donde la vacuna comprende un conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), opcionalmente adsorbido sobre fosfato de aluminio, o no adsorbido sobre un adyuvante (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

34. El método de la reivindicación 33, en donde el Hib se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

35. El método de las reivindicaciones 1 a 34, en donde la vacuna comprende uno o más conjugados de una proteína portadora, y un sacárido capsular de una bacteria seleccionada a partir del grupo de *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, y *Neisseria meningitidis* tipo Y, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos, o no adsorbido sobre un adyuvante (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los antígenos diferentes de los antígenos de sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* tipo A, C, W, ó Y).

36. El método de la reivindicación 35, en donde el uno o más conjugados de una proteína portadora y un sacárido capsular de una bacteria seleccionada a partir del grupo de *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, y *Neisseria meningitidis* tipo Y, se agregan antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

37. El método de las reivindicaciones 1 a 36, en donde la

vacuna comprende una vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis* tipo B (MenB), o lipo-oligosacárido, o un sacárido capsular MenB conjugado, o un derivado del mismo, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos, o no adsorbido sobre un adyuvante (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los antígenos diferentes de los antígenos MenB).

38. El método de la reivindicación 37, en donde la vacuna que comprende una vesícula de membrana externa de MenB o el lipo-oligosacárido, o el sacárido capsular de MenB conjugado, se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

39. El método de las reivindicaciones 1 a 38, en donde la vacuna comprende un sacárido de Vi a partir de *Salmonella typhi* conjugado con una proteína portadora, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos, o no adsorbido sobre un adyuvante (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

40. El método de la reivindicación 39, en donde el sacárido de Vi de *Salmonella typhi* conjugado con una proteína portadora, se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

41. El método de las reivindicaciones 1 a 40, en donde la vacuna comprende un antígeno a partir de Hepatitis A, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción

tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

5 42. El método de la reivindicación 41, en donde el antígeno de Hepatitis A se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

43. El método de las reivindicaciones 1 a 42, el cual comprende un paso adicional de agregar un adyuvante.

10 44. El método de las reivindicaciones 1 a 43, en donde el contenido de aluminio total en la vacuna es de 200 a 1,000 microgramos, de 300 a 900 microgramos, de 400 a 800 microgramos, de 500 a 700 microgramos, o de alrededor o exactamente 630 microgramos de Al^{3+} por dosis de 0.5 mililitros.

15 45. El método de la reivindicación 44, en donde el contenido de Al^{3+} en la vacuna es todo de hidróxido de aluminio o todo de fosfato de aluminio.

20 46. El método de la reivindicación 44, en donde el contenido de Al^{3+} en la vacuna es una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio en la siguiente proporción: 1:8-8:1, 1:4-4:1, 3:8-8:3, 1:2-2:1, ó 1:1 (peso:peso de Al^{3+} : Al^{3+}) de fosfato de aluminio:hidróxido de aluminio.

25 47. El método de la reivindicación 44, en donde el contenido de Al^{3+} en la vacuna es una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio en la siguiente proporción: 12:1-4:1, 11:1-5:1, 10:1-6:1, 9:1-7:1 u 8:1 (peso:peso de Al^{3+} : Al^{3+}) de fosfato de aluminio:hidróxido de aluminio.

48. El método de las reivindicaciones 1 a 47, el cual comprende el paso de agregar un adyuvante de sal de aluminio libre a la vacuna, en la cantidad de 0 a 300 microgramos, de 50 a 250 microgramos, de 75 a 200 microgramos, de 100 a 150 microgramos, o de alrededor o exactamente 115 microgramos de Al^{3+} por dosis de 0.5 mililitros.

49. El método de la reivindicación 48, en donde el adyuvante de sal de aluminio libre es todo de $\text{Al}(\text{OH})_3$ o todo de AlPO_4 .

50. El método de la reivindicación 48, en donde el adyuvante de sal de aluminio libre es una mezcla de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y AlPO_4 en la siguiente proporción (peso:peso de $\text{Al}^{3+}:\text{Al}^{3+}$): 1:1-1:6, 1:1.1-1:5, 1:1.2-1:4, 1:1.3-1:3, 1:1.4-1:2.

51. El método de la reivindicación 48, en donde el adyuvante de sal de aluminio libre es una mezcla de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y AlPO_4 en la siguiente proporción (peso:peso de $\text{Al}^{3+}:\text{Al}^{3+}$): 6:1-1:1, 5:1-1.1:1, 4:1-1.2:1, 3:1-1.3:1, 2:1-1.4:1.

52. El método de las reivindicaciones 48 a 51, en donde el adyuvante de sal de aluminio libre se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 7.

53. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 52, en donde el poliovirus inactivado tipo 1, si está presente en la vacuna, es la cepa Mahoney.

54. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, en donde el poliovirus inactivado tipo 2, si está presente en la vacuna, es la cepa MEF-1.

55. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 54, en donde el poliovirus inactivado tipo 3, si está presente en la vacuna, es la cepa Saukett.

5

10

15

20

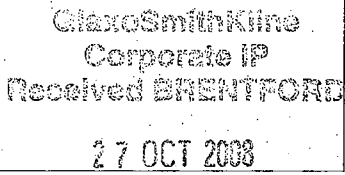
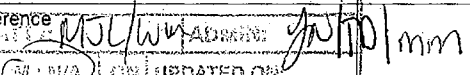
25

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(PCT Rule 71.1)

To: GLAXO SMITH KLINE 980 Great West Road Brentford TW8 9GS GRANDE BRETAGNE		Date of mailing (day/month/year) 22.10.2008	
			
Applicant's or agent's file reference EKB/VB62615			
International application No. PCT/EP2007/059391		International filing date (day/month/year) 07.09.2007	Priority date (day/month/year) 07.09.2006
Applicant GLAXO SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			

IMPORTANT NOTIFICATION

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

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 Digiusto, Michela Tel. +49 89 2399-8162
---	--



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 EKB/VB62615	FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2007/059391	International filing date (day/month/year) 07.09.2007	Priority date (day/month/year) 07.09.2006
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K39/13		
Applicant GLAXO SMITHKLINE 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>5</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 <u>8</u> 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 2008-08-07	Date of completion of this report 22.10.2008	
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/EP2007/059391

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

1-62 as originally filed

Claims, Numbers

1-55 received on 07.08.2008 with letter of 07.08.2008

Drawings, Sheets

1/3-3/3 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*):

5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2007/059391

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>1-55</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-55</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-55</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Re Item V

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

Cited Documents

Reference is made to the following documents:

- D1: HERREMANS T.M.P.T. ET AL.: "Induction of mucosal immunity by inactivated poliovirus vaccine is dependent on previous mucosal contact with live virus." J. IMMUNOL., vol. 162, 1999, pages 511-5018, XP002463164
- D2: DOI Y ET AL: "PROGRESS WITH INACTIVATED POLIOVIRUS VACCINES DERIVED FROM THE SABIN STRAINS" DEVELOPMENTS IN BIOLOGICALS, KARGER, BASEL, CH, vol. 105, 2001, pages 163-169, XP009040789 ISSN: 1424-6074

Article 33(2) PCT

The subject matter of the claims is considered to be novel in light of the prior art since a multivalent vaccine containing IPV type 1 at a dose of between 10 and 20 D-antigen units (DU) has not previously been disclosed.

Article 33(3) PCT

The subject matter of claims 1-55 is considered inventive (Article 33(3) PCT)

The closest prior art is D1 which discloses combination vaccines containing three IPV serotypes, diphtheria and tetanus antigens. Serotypes 1, 2 and 3 of polio are represented in the vaccine at 40, 4 and 7.5 D-antigen units respectively.

The differences between the subject matter of claim 1 and D1 is that in claim 1, the serotype 1 polio virus is present at between 10 and 20 D units. Also, in the combination vaccine of claim 1, the antigens are mixed in a certain order.

The technical effect arising from the antigen concentration difference is that less antigen is used to generate immune responses. Whilst the method of production appears to have an effect on the vaccine potency.

The problem to be solved may therefore be considered as being to provide a combination vaccine comprising polio and other antigens whereby the polio type 1 virus is at a lowered concentration.

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

International application No.

PCT/EP2007/059391

The subject matter of claim 1 solves this problem and is considered inventive for the following reasons. Firstly, the skilled person would not be prompted to use a lower than normal dose of IPV in such a vaccine as the current accepted standard dose of type 1 IPV for use in vaccines is 40 DU, as shown by D1. Furthermore, whilst D2 shows that immune responses against type 1 polio virus can be achieved with antigen concentrations of 11 D units (see figure 3, top graph), it is evident that not all rats given this dose seroconverted after one dose and that after a boost, the mean antibody titres were not as high as in those which had received two 32 DU immunisations. Hence the skilled person would not view it as obvious to use a lower polio antigen concentration falling within the claimed range using previously known manufacturing techniques. Claim 1 is therefore inventive.

Claims 2-55 are dependent on claim 1 and are therefore also inventive (Article 33(3) PCT).

18. 08. 2008

Claims

(81)

1. A method of making a vaccine (i.e. a combination vaccine) comprising inactivated poliovirus type 1, comprising the steps of: mixing diphtheria toxoid and tetanus toxoid, followed by the addition of inactivated poliovirus type 1 at a dose greater than 10 D-antigen units and less than 20 D-antigen units and optionally IPV type(s) 2 and/or 3 (IPV).
2. The method of claim 1, wherein the vaccine comprises inactivated poliovirus type 1 at 26-49%, 30-45%, 33-40%, or 35-37% of a standard 40 D-antigen unit dose.
3. The method of claim 1 or 2, wherein the vaccine additionally comprises inactivated poliovirus type 3 at a dose of 8-20 D-antigen units, 9-19 D-antigen units, 10-18 D-antigen units, 11-17 D-antigen units, 12-16 D-antigen units, or 13-15 D-antigen units; for instance around or exactly 14 D-antigen units.
4. The method of claim 3, wherein the vaccine comprises inactivated poliovirus type 3 at a dose of greater than 8 and less than 20 D-antigen units.
5. The method of claims 1-4, wherein the vaccine additionally comprises inactivated poliovirus type 2 at a dose of 2-4 D-antigen units.
6. The method of claim 5, wherein the vaccine comprises inactivated poliovirus type 2 at a dose greater than 2 D-antigen units and less than 4 D-antigen units, or at a dose around or exactly 3 D-antigen units.
7. The method of claims 1-6, comprising the subsequent step of adjusting pH to 6.5 ± 0.5 , or pH5.9-7.2, or pH6-7, or pH6.2-6.8, or pH6.4-6.6.
8. The method of claims 1-7, comprising the subsequent steps of adding a killed whole-cell or acellular pertussis component(s) and a pharmaceutically acceptable

excipient, optionally where free aluminium phosphate is present prior to the addition of the antigens.

9. The method of claims 1-8, comprising the additional step of adding Hepatitis B surface antigen prior to pH adjustment or prior to the addition of IPV.

10. The method of claims 1-9, comprising the additional step of mixing one or more antigens from a pathogen selected from a list consisting of: *Haemophilus influenzae* b, *Neisseria meningitidis* type A, *Neisseria meningitidis* type C, *Neisseria meningitidis* type W, *Neisseria meningitidis* type Y, *Neisseria meningitidis* type B, *Salmonella typhi* and Hepatitis A, with diphtheria toxoid, tetanus toxoid, inactivated poliovirus types 1, 2 and/or 3 and optionally Hepatitis B surface antigen prior to pH adjustment.

11. The method of claims 1-10, wherein the vaccine comprises inactivated poliovirus type 1 adsorbed onto aluminium hydroxide, or aluminium phosphate, or a mixture of both (wherein adsorption takes place either before mixing with antigen other than IPV, or wherein adsorption takes place after mixing with antigen other than IPV).

12. The method of claim 11, wherein the IPV type 1 is added prior to the pH adjustment step of claim 7.

13. The method of claims 1-12, wherein the vaccine comprises inactivated poliovirus type 2 adsorbed onto aluminium hydroxide, or aluminium phosphate, or a mixture of both (wherein adsorption takes place either before mixing with antigen other than IPV, or wherein adsorption takes place after mixing with antigen other than IPV).

14. The method of claim 13, wherein the IPV type 2 is added prior to the pH adjustment step of claim 7.

15. The method of claims 1-14, wherein the vaccine comprises inactivated poliovirus type 3 adsorbed onto aluminium hydroxide, or aluminium phosphate, or

a mixture of both (wherein adsorption takes place either before mixing with antigen other than IPV, or wherein adsorption takes place after mixing with antigen other than IPV).

16. The method of claim 15, wherein the IPV type 3 is added prior to the pH adjustment step of claim 7.

17. The method of claims 1-16, wherein the vaccine comprises IPV types 1, 2 and 3 adsorbed onto an aluminium salt (wherein adsorption takes place either before mixing with antigen other than IPV, or wherein adsorption takes place after mixing with antigen other than IPV).

18. The method of claims 1-17, wherein the vaccine comprises IPV types 1, 2 and 3 adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both (wherein adsorption takes place either before mixing with antigen other than IPV, or wherein adsorption takes place after mixing with antigen other than IPV).

19. The method of claims 1-18, wherein the vaccine comprises diphtheria toxoid, optionally adsorbed onto aluminium hydroxide, or aluminium phosphate, or a mixture of both (wherein adsorption takes place either before or after mixing with other antigens).

20. The method of claim 19, wherein the diphtheria toxoid is added prior to the pH adjustment step of claim 7.

21. The method of claims 1-20, wherein the vaccine comprises tetanus toxoid, optionally adsorbed onto aluminium hydroxide, or aluminium phosphate, or a mixture of both (wherein adsorption takes place either before or after mixing with other antigens).

22. The method of claim 21, wherein the tetanus toxoid is added prior to the pH adjustment step of claim 7.

23. The method of claims 1-22, wherein the vaccine comprises killed whole cell *Bordetella pertussis* (Pw), optionally adsorbed onto aluminium hydroxide, or aluminium phosphate, or a mixture of both (wherein adsorption takes place either before or after mixing with other antigens).
24. The method of claim 23, wherein the Pw is added after the pH adjustment step of claim 7.
25. The method of claim 24, wherein the killed whole-cell *Bordetella pertussis* is adsorbed onto aluminium phosphate (wherein adsorption takes place either before or after mixing with other antigens).
26. The method of claim 24, wherein the Pw is added after the pH adjustment step of claim 7.
27. The method of claims 1-22, wherein the vaccine comprises two or more acellular pertussis components (Pa) (e.g. pertussis toxoid (PT), filamentous haemagglutinin (FHA) and pertactin (PRN)), optionally adsorbed onto aluminium hydroxide, or aluminium phosphate, or a mixture of both (wherein adsorption takes place either before or after mixing with antigens other than acellular pertussis antigens).
28. The method of claim 27, wherein the Pa is added after the pH adjustment step of claim 7.
29. The method of claim 28, wherein the two or more acellular pertussis components (Pa) are adsorbed onto aluminium phosphate (wherein adsorption takes place either before or after mixing with antigens other than acellular pertussis antigens).
30. The method of claim 29, wherein the Pa is added after the pH adjustment step of claim 7.

31. The method of claims 1-30, wherein the vaccine comprises Hepatitis B surface antigen, optionally adsorbed onto aluminium phosphate (wherein adsorption takes place either before or after mixing with other antigens).

32. The method of claim 31, wherein the Hepatitis B surface antigen is added prior to the pH adjustment step of claim 7.

33. The method of claims 1-32, wherein the vaccine comprises a conjugate of a carrier protein and the capsular saccharide of *Haemophilus influenzae* type B (Hib), optionally adsorbed onto aluminium phosphate or unadsorbed onto adjuvant (wherein adsorption takes place either before or after mixing with other antigens).

34. The method of claim 33, wherein the Hib is added prior to the pH adjustment step of claim 7.

35. The method of claims 1-34, wherein the vaccine comprises one or more conjugates of a carrier protein and a capsular saccharide of a bacterium selected from the group *Neisseria meningitidis* type A, *Neisseria meningitidis* type C, *Neisseria meningitidis* type W and *Neisseria meningitidis* type Y, optionally adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both or unadsorbed onto adjuvant (wherein adsorption takes place either before or after mixing with antigens other than *Neisseria meningitidis* type A, C, W or Y capsular saccharide antigens).

36. The method of claim 35, wherein the one or more conjugates of a carrier protein and a capsular saccharide of a bacterium selected from the group *Neisseria meningitidis* type A, *Neisseria meningitidis* type C, *Neisseria meningitidis* type W and *Neisseria meningitidis* type Y are added prior to the pH adjustment step of claim 7.

37. The method of claims 1-36, wherein the vaccine comprises a *Neisseria meningitidis* type B (MenB) outer membrane vesicle or LOS or a conjugated MenB capsular saccharide, or derivative thereof, optionally adsorbed onto

aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both or unadsorbed onto adjuvant (wherein adsorption takes place either before or after mixing with antigens other than MenB antigens).

38. The method of claim 37, wherein the MenB outer membrane vesicle or LOS or the conjugated MenB capsular saccharide is added prior to the pH adjustment step of claim 7.

39. The method of claims 1-38, wherein the vaccine comprises a Vi saccharide from *Salmonella typhi* conjugated to a carrier protein, optionally adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both or unadsorbed onto adjuvant (wherein adsorption takes place either before or after mixing with other antigens).

40. The method of claim 39, wherein the Vi saccharide from *Salmonella typhi* conjugated to a carrier protein is added prior to the pH adjustment step of claim 7.

41. The method of claims 1-40, wherein the vaccine comprises an antigen from Hepatitis A, optionally adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both (wherein adsorption takes place either before or after mixing with other antigens).

42. The method of claim 41, wherein the antigen from Hepatitis A is added prior to the pH adjustment step of claim 7.

43. The method of claims 1-42, comprising an additional step of adding an adjuvant.

44. The method of claims 1-43, wherein total aluminium content in the vaccine is 200-1000 μ g, 300-900 μ g, 400-800 μ g, 500-700 μ g or around or exactly 630 μ g Al³⁺ per 0.5mL dose.

45. The method of claim 44, wherein Al^{3+} content in the vaccine is all aluminium hydroxide or all aluminium phosphate.
46. The method of claim 44, wherein Al^{3+} content in the vaccine is a mixture of aluminium hydroxide and aluminium phosphate in the following ratio: 1:8-8:1, 1:4-4:1, 3:8-8:3, 1:2-2:1 or 1:1 (w:w Al^{3+} : Al^{3+}) of aluminium phosphate: aluminium hydroxide.
47. The method of claim 44, wherein Al^{3+} content in the vaccine is a mixture of aluminium hydroxide and aluminium phosphate in the following ratio 12:1-4:1, 11:1-5:1, 10:1-6:1, 9:1-7:1 or 8:1 (w:w Al^{3+} : Al^{3+}) of aluminium phosphate: aluminium hydroxide.
48. The method of claims 1-47, comprising a step of adding free aluminium salt adjuvant to the vaccine to the amount of 0-300 μg , 50-250 μg , 75-200 μg , 100-150 μg or around or exactly 115 μg of Al^{3+} per 0.5mL dose.
49. The method of claim 48, wherein the free aluminium salt adjuvant is all $\text{Al}(\text{OH})_3$ or all AlPO_4 .
50. The method of claim 48, wherein the free aluminium salt adjuvant is a mixture of $\text{Al}(\text{OH})_3$ and AlPO_4 in the following ratio (w:w Al^{3+} : Al^{3+}): 1:1-1:6, 1:1.1-1:5, 1:1.2-1:4, 1:1.3-1:3, 1:1.4-1:2.
51. The method of claim 48, wherein the free aluminium salt adjuvant is a mixture of $\text{Al}(\text{OH})_3$ and AlPO_4 in the following ratio (w:w Al^{3+} : Al^{3+}): 6:1-1:1, 5:1-1.1:1, 4:1-1.2:1, 3:1-1.3:1, 2:1-1.4:1.
52. The method of claims 48-51, wherein the free aluminium salt adjuvant is added prior to the pH adjustment step of claim 7.
53. The method of any of claims 1-52, wherein IPV type 1, if present in the vaccine, is the Mahoney strain.

54. The method of any of claims 1-53, wherein IPV type 2, if present in the vaccine, is the MEF-1 strain.

55. The method of any of claims 1-54, wherein IPV type 3, if present in the vaccine, is the Saukett strain.

VACUNA

RESUMEN-OBJETO Y FINALIADAD DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere al campo de las vacunas para
proteger contra polio, y en particular a vacunas de combinación para
proteger contra las enfermedades de polio, difteria, tétanos, y
tosferina. Específicamente, se proporcionan vacunas que
comprenden una dosis reducida de poliovirus inactivado (IPV), que
10 pueden mantener un nivel adecuado o mejorado de protección contra
la polio.

* * * * *

15

20

25

VACUNA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere al campo de las vacunas para proteger contra polio, y en particular a vacunas de combinación para proteger contra las enfermedades de polio, difteria, tétanos, y tosferina.

ANTECEDENTES

10 Las vacunas de combinación (que proporcionen protección contra múltiples patógenos) son muy deseables para minimizar el número de inmunizaciones requeridas para conferir protección contra múltiples patógenos, para reducir los costos de administración, y para aumentar los índices de aceptación y cobertura. El fenómeno bien documentado de la competencia (o interferencia) antigénica
15 complica el desarrollo de vacunas de múltiples componentes. La interferencia antigénica se refiere a la observación de que la administración de múltiples antígenos con frecuencia da como resultado una respuesta disminuida a ciertos antígenos en relación con la respuesta inmune observada cuando estos antígenos se
20 administran individualmente.

Se conocen vacunas de combinación que pueden prevenir *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, y opcionalmente el poliovirus inactivado (IPV), y/o el virus de Hepatitis B, y/o la infección por *Haemophilus* tipo B (véanse,
25 por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Números WO

93/24148, WO97/00697 y WO2000/030678).

Después de muchos años de investigación, la dosis estándar de las vacunas de polio aceptada como efectiva dentro de la comunidad de las vacunas en la actualidad, contiene 40 unidades de antígeno D del poliovirus inactivado tipo 1 (Mahoney), 8 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 2 (MEF-1), y 32 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 3 (Saukett) (por ejemplo, Infanrix-IPV^{MR}).

De una manera sorprendente, los presentes inventores han encontrado que las dosis reducidas de poliovirus inactivado pueden mantener un nivel adecuado o mejorado de protección contra la polio. Estas vacunas llevan ventajas considerables, incluyendo la capacidad para proporcionar más dosis de vacunas de poliovirus inactivado para los individuos que lo necesiten.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

De conformidad con lo anterior, la presente invención proporciona diferentes vacunas de poliovirus inactivado de dosis reducida (que pueden tener solamente componentes de poliovirus inactivado, o pueden tener componentes de poliovirus inactivado combinados con otros antígenos).

De conformidad con lo anterior, en un aspecto, la presente invención proporciona una vacuna de poliovirus inactivado de la invención, la cual comprende el poliovirus inactivado tipo 1 en una dosis mayor de 10 unidades de antígeno D, y menos de 20 unidades de antígeno D, por ejemplo, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, ó 19

unidades de antígeno D.

En una realización, la presente invención proporciona una vacuna de poliovirus inactivado de la invención, la cual comprende el poliovirus inactivado tipo 3 en una dosis de 8 a 20 unidades de antígeno D, por ejemplo 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ó 20 unidades de antígeno D.

En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna de poliovirus inactivado de la invención, la cual comprende el poliovirus inactivado tipo 2 en una dosis de 2 a 4 unidades de antígeno D, por ejemplo 2, 3, ó 4 unidades de antígeno D.

En una realización adicional, la presente invención proporciona una vacuna de poliovirus inactivado de la invención, la cual comprende además una vacuna de toxoide de difteria y/o toxoide de tétanos y/o de tosferina en la forma de una vacuna Pw de células enteras muertas, o antígenos de tosferina acelulares.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una vacuna de poliovirus inactivado de la invención, la cual es una vacuna de combinación de DTP-IPV libre de tiomersal que comprende el poliovirus inactivado tipo 1 en una dosis de entre 10 y 36 unidades de antígeno D.

En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna de combinación de DTP-IPV libre de tiomersal de la invención, la cual comprende el poliovirus inactivado tipo 2 en una dosis de 2 a 7 unidades de antígeno D, por ejemplo 5, 6, ó 7 unidades de antígeno D.

En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna de combinación de DTP-IPV libre de tiomersal de la invención, la cual comprende el poliovirus inactivado tipo 3 en una dosis de 8 a 29 unidades de antígeno D, por ejemplo 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, ó 29 unidades de antígeno D.

En una realización adicional, las vacunas de la presente invención también pueden comprender uno o más antígenos seleccionados a partir del grupo que consiste en: antígeno superficial de Hepatitis B, antígenos de *Haemophilus influenzae* B, antígenos de *Neisseria meningitidis* A, antígenos de *Neisseria meningitidis* C, antígenos de *Neisseria meningitidis* W, antígenos de *Neisseria meningitidis* Y, flictena o antígenos de *Neisseria meningitidis* B, antígenos de hepatitis A, y antígenos de *Salmonella typhi*, en particular antígenos de sacáridos capsulares de estas bacterias.

También se proporcionan métodos para la elaboración de las vacunas de la invención.

DEFINICIONES

El término "vacuna" es opcionalmente sustituible con el término "composición inmunogénica", y *viceversa*.

"Unidades de antígeno D" (también referidas como "Unidades Internacionales" o UI): La forma antigénica D del poliovirus induce anticuerpos neutralizantes protectores. Las unidades de antígeno D referidas en la presente (por ejemplo, en las vacunas de la invención) son las unidades totales medidas de antígeno D de cada tipo de antígeno de poliovirus inactivado a granel no adsorbido antes

de la formulación de la vacuna final, que se agregan en cada dosis humana de la vacuna formulada (típicamente un volumen final de 0.5 mililitros). Los métodos confiables para medir las unidades de antígeno D son bien conocidos en este campo, y son publicados, por ejemplo, por la Farmacopea Europea. Por ejemplo, las unidades de antígeno D se pueden medir utilizando la prueba ELISA, como se describe en el Ejemplo 1 ("cuantificación de antígeno D mediante ELISA") que se encuentra más adelante. La Farmacopea Europea proporciona una muestra de prueba (Preparación de referencia biológica de la Farmacopea Europea - disponible en Ph. Eur. Secretariat, por ejemplo Código P 216 0000), para la estandarización de estos métodos entre los fabricantes (Pharmeuropa Special Issue, Bio 96-2). Por consiguiente, en este campo se entiende bien el valor de la unidad de antígeno D.

El término "dosis" en la presente, es típicamente una administración de la vacuna de la invención, la cual es típicamente una inyección. Una dosis humana típica es de 0.5 mililitros. Desde luego, se pueden administrar diferentes dosis en un programa de administración de vacuna.

El término "IPV", o una vacuna que comprenda estos componentes en la misma, pretende significar el poliovirus inactivado tipo 1 (por ejemplo, Mahoney, como se utiliza de preferencia, o Brunhilde como es comercializado por Statens Serum Institut bajo el nombre de DiTeKiPol), tipo 2 (por ejemplo, MEF-1), o tipo 3 (por ejemplo, Saukett), o una combinación de cualesquiera dos o los tres

de estos tipos. Un ejemplo de una vacuna de poliovirus inactivado de dosis completa (o estándar) (40-8-32 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipos 1, 2, y 3, respectivamente), para los propósitos de esta invención, podría ser la Poliorix® (GSK Biologicals S. A.). Por consiguiente, cuando se menciona en la presente que el X% de una dosis estándar de poliovirus inactivado está presente en una vacuna de la invención, esto significa que las unidades de antígeno D que igualan a X% de 40, 8, y/o 32 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipos 1, 2, y/o 3, respectivamente (medidas en cada tipo de antígeno de poliovirus inactivado a granel), se formulan dentro de cada dosis de esta vacuna.

Los términos "lipopolisacárido" (LPS) y "lipo-oligosacárido" (LOS) son intercambiables.

El término "sacárido", a través de toda esta memoria descriptiva, puede indicar polisacárido u oligosacárido, e incluye ambos. El antígeno de sacárido capsular puede ser un polisacárido de longitud completa, o se puede extender hasta sacáridos y oligosacáridos de tamaño bacteriano (que tienen naturalmente un bajo número de unidades de repetición, o que son polisacáridos de un tamaño reducido para mejor manejo, pero que todavía son capaces de inducir una respuesta inmune protectora en un huésped), los cuales son bien conocidos en la técnica de las vacunas (véase, por ejemplo, la Patente Europea Número EP 497525).

El término "ácido nucleico" en la presente, puede comprender

ácido desoxirribonucleico (ADN) de una sola cadena o de doble cadena, o ácido ribonucleico (ARN) de una sola cadena o de doble cadena, o una mezcla de los mismos.

5 El término "componente(s)" de un patógeno, o "componente(s) que proporciona protección contra este patógeno" dentro de las vacunas de la invención en la presente, pretende significar uno o más antígenos a partir de ese patógeno.

10 Los términos "alrededor de" o "aproximadamente" en la presente, se toman para significar ± 10 por ciento del valor mencionado, pero se debe mantener dentro del contexto de uso.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Evolución de la potencia relativa (RP) de DTPwSF-HB-IPV "Método de Producción 3" con la dosis del poliovirus inactivado (IPV).

15 Se examinó la potencia del poliovirus inactivado de dosis reducida de las formulaciones del "método de producción 3" *in vivo* en comparación con la formulación de referencia (formulación Poliorix y DTPaIPVHB). La potencia relativa del poliovirus inactivado se midió en dosis del 100 por ciento, 50 por ciento, 25 por ciento, y
20 12.5 por ciento de la dosis estándar de poliovirus inactivado (40/8/32 unidades de antígeno D para los tipos 1/2/3).

Figura 2. Evolución de la potencia relativa (RP) de la hoja de cálculo de la formulación de DTPwSF-HB-HPV.

25 Se examinó la potencia del poliovirus inactivado de dosis reducida para ambas formulaciones del "método de producción 3" y

del "método de producción 4" *in vivo* en comparación con las formulaciones de referencia (formulación Poliorix y DTPaIPVHB). La potencia relativa se midió tanto para el "método de producción 3" como para el "método de producción 4" a un 25 por ciento de la dosis estándar del poliovirus inactivado (40/8/32 unidades de antígeno D para los tipos 1/2/3) en comparación con un placebo con el 25 por ciento de poliovirus inactivado solamente.

Figura 3. Potencia relativa de poliovirus inactivado tipos 1, 2, y 3 en el tiempo 0 y a los 8 meses.

Se midió la potencia relativa del poliovirus inactivado [en relación con DTPaHBIPV (Padiarix) (Figura 3a) o Poliorix (Figura 3b)], para determinar si el componente Hib tiene un efecto sobre la potencia del poliovirus inactivado, y para evaluar la estabilidad del poliovirus inactivado a través del tiempo con diferentes dosis de poliovirus inactivado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona una vacuna (por ejemplo, una vacuna de combinación), la cual comprende antígenos de poliovirus (IPV), y opcionalmente *Corynebacterium diphtheriae* (D), *Clostridium tetani* (T), *Bordetella pertussis* (P) o Hepatitis B.

Los Antígenos de la Invención

Componentes de la vacuna del poliovirus inactivado

Las vacunas de la invención pueden estar comprendidas del poliovirus inactivado tipo 1 o del poliovirus inactivado tipo 2 o del poliovirus inactivado tipo 3, o de los poliovirus inactivados tipos 1 y

2, o de los poliovirus inactivados tipos 1 y 3, o de los poliovirus inactivados tipos 2 y 3, o de los poliovirus inactivados tipos 1, 2, y 3.

Los métodos para la preparación de poliovirus inactivado (IPV) son bien conocidos en este campo. En una realización, el poliovirus inactivado debe comprender los tipos 1, 2, y 3, como es común en la técnica de las vacunas, y puede ser la vacuna de polio de Salk, la cual es inactivada con formaldehído (véase, por ejemplo, Sutter y colaboradores, 2000, *Pediatr. Clin. North Am.* 47:287; Zimmerman & Spann 1999, *Am. Fam. Physician* 59:113; Salk y colaboradores, 1954, *Official Monthly Publication of the American Public Health Association* (Publicación Oficial Mensual de la Asociación Americana de Salud Pública) 44(5):563; Hennesen, 1981, *Develop. Biol. Standard* 47:139; Budowsky, 1991, *Adv. Virus Res.* 39:255).

En una realización, el poliovirus inactivado no es adsorbido (por ejemplo, antes de mezclarse con otros componentes, si están presentes). En otra realización, los componentes de poliovirus inactivado de la invención pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio (por ejemplo, antes o después de mezclarse con otros componentes, si están presentes). En otra realización, los componentes de poliovirus inactivado de la invención pueden ser absorbidos sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una realización adicional, los componentes de poliovirus inactivado pueden ser absorbidos sobre una mezcla de tanto hidróxido de aluminio como fosfato de aluminio. Si son adsorbidos, uno o más componentes de poliovirus inactivado pueden

ser adsorbidos por separado o juntos como una mezcla. El poliovirus inactivado se puede estabilizar mediante un proceso de secado particular, como se describe en la Publicación Internacional Número WO2004/039417.

5

El poliovirus se puede hacer crecer en un cultivo celular. El cultivo celular puede ser una línea celular VERO, o PMKC, que es una línea celular continua derivada a partir de riñón de mono. Las células VERO pueden ser convenientemente microportadores cultivados. El cultivo de las células VERO antes y durante la
10 infección viral puede involucrar el uso de material derivado de bovino, tal como suero de becerro, y este material se debe obtener de fuentes que estén libres de encefalitis espongiforme bovina (BSE). El cultivo también puede involucrar materiales tales como hidrolizado de lactalbúmina. Después del crecimiento, los viriones se
15 pueden purificar empleando técnicas tales como ultrafiltración, diafiltración, y cromatografía. Antes de su administración a los pacientes, los virus se deben inactivar, y esto se puede lograr mediante su tratamiento con formaldehído.

20

Los virus se pueden cultivar, purificar, e inactivar individualmente, y luego se pueden combinar para dar una mezcla concentrada a granel para el uso en la vacuna de poliovirus inactivado, o para agregarse a los componentes adsorbidos de antígeno de difteria y tétanos, y de tosferina, para las vacunas que comprenden DTPw-IPV o DTPa-IPV.

25

Los antígenos en las vacunas de la invención estarán

presentes en "cantidades inmunológicamente efectivas", es decir, la administración de la cantidad a un individuo, ya sea en una sola dosis o como parte de una serie, que sea efectiva para el tratamiento o la prevención de la enfermedad. El tratamiento de dosificación
5 puede ser un programa de una sola dosis o un programa de múltiples dosis (por ejemplo, incluyendo dosis de refuerzo).

Las dosis convencionales de las vacunas de polio en la actualidad tienden a contener 40 unidades de antígeno de poliovirus inactivado tipo 1, 8 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado
10 tipo 2, y 32 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 3 (por ejemplo, Infanrix-IPV^{MR}).

Sin embargo, los presentes inventores han encontrado de una manera sorprendente que se pueden utilizar dosis reducidas de poliovirus inactivado para obtener una buena respuesta inmune. En
15 una realización, una dosis de vacuna de poliovirus inactivado de la presente invención puede comprender entre 10 y 36 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 1 (por ejemplo, de 11 a 32, de 12 a 28, de 13 a 24, de 14 a 20, o de 15 a 19 unidades de antígeno D). En otra realización, una dosis de vacuna de poliovirus
20 inactivado de la presente invención puede comprender poliovirus inactivado tipo 1 en una dosis de 10 a 20 unidades de antígeno D, o una dosis mayor de 10 unidades de antígeno D y menor de 20 unidades de antígeno D. En otra realización, una dosis de vacuna de la presente invención puede comprender del 26 al 49 por ciento, del
25 30 al 45 por ciento, del 33 al 40 por ciento, del 35 al 37 por ciento, o

aproximadamente o exactamente una tercera parte de una dosis estándar de 40 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 1 (equivalente a aproximadamente 10.4 a 19.6, 12 a 18, 13.2 a 16, 14 a 14.8, ó 13.3 unidades de antígeno D). En otra realización, una
5 dosis de vacuna de poliovirus inactivado de la presente invención puede comprender de 11 a 32 unidades de antígeno D, de 12 a 28 unidades de antígeno D, de 13 a 24 unidades de antígeno D, o de 14 a 20 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 1.

De una manera alternativa, una dosis de vacuna de poliovirus
10 inactivado de la presente invención puede comprender de 10 a 19.5 unidades de antígeno D, de 12 a 19 unidades de antígeno D, de 14 a 18.5 unidades de antígeno D, o de 15 a 17 unidades de antígeno D; por ejemplo, alrededor de, o exactamente 16 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 1.

En una realización adicional, las vacunas de la presente
15 invención pueden comprender menos de 4 unidades de antígeno D, de 2 a 4 unidades de antígeno D (equivalentes a del 25 al 50 por ciento de una dosis estándar de 8 unidades de antígeno D), o alrededor o exactamente 3 unidades de antígeno D de poliovirus
20 inactivado tipo 2 (equivalente al 37.5 por ciento de una dosis estándar de 8 unidades de antígeno D).

En otra realización, la vacuna de la presente invención puede comprender aproximadamente o exactamente una tercera parte de una dosis estándar de 8 unidades de antígeno D de poliovirus
25 inactivado tipo 2 (equivalente a aproximadamente 2.7 unidades de

antígeno D).

En una realización adicional, las vacunas de la presente invención pueden comprender de 2 a 7 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 2. En otra realización, una dosis de vacuna
5 de poliovirus inactivado de la presente invención puede comprender de 3 a 6 unidades de antígeno D, o de 4 a 5 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 2.

De una manera alternativa, una dosis de vacuna de poliovirus inactivado de la presente invención puede comprender de 2 a 4.5
10 unidades de antígeno D, de 2.5 a 4 unidades de antígeno D, o de 3 a 3.5 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 2.

En una realización adicional, las vacunas de la presente invención pueden comprender de 8 a 20 unidades de antígeno D, más de 8 y menos de 20 unidades de antígeno D, de 9 a 19 unidades
15 de antígeno D, de 10 a 18 unidades de antígeno D, de 11 a 17 unidades de antígeno D, de 12 a 16 unidades de antígeno D, o de 13 a 15 unidades de antígeno D; por ejemplo, alrededor o exactamente 14 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 3 (equivalentes a del 25 al 62.5 por ciento, del 28.125 al 9.375 por
20 ciento, del 31.25 al 46.875 por ciento, o al 43.75 por ciento de una dosis estándar de 32 unidades de antígeno D).

En otra realización, la vacuna de la presente invención puede comprender aproximadamente o exactamente una tercera parte de una dosis estándar de 32 unidades de antígeno D de poliovirus
25 inactivado tipo 3 (equivalente a aproximadamente 10.7 unidades de

antígeno D).

En una realización adicional, una dosis de vacuna de poliovirus inactivado de la presente invención puede comprender de 8 a 29 unidades de antígeno D, de 9 a 26 unidades de antígeno D, de 10 a 23 unidades de antígeno D, de 11 a 20 unidades de antígeno D, de 12 a 17 unidades de antígeno D, o de 13 a 14 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 3.

De una manera alternativa, una dosis de vacuna de poliovirus inactivado de la presente invención puede comprender de 8 a 19.5 unidades de antígeno D, de 9 a 19 unidades de antígeno D, de 10 a 18.5 unidades de antígeno D, de 11 a 18 unidades de antígeno D, de 12 a 17.5 unidades de antígeno D, de 13 a 17 unidades de antígeno D, o de 14 a 16 unidades de antígeno D; por ejemplo, alrededor o exactamente 15 unidades de antígeno D.

15 **Componentes de vacuna DTP**

Las vacunas DTP son vacunas bien conocidas que previenen o tratan la difteria, el tétanos, y la enfermedad por *B. pertussis*. Las vacunas de la invención pueden comprender componentes de difteria, tétanos, y/o tosferina.

20 El antígeno de difteria típicamente es un toxoide de difteria. La preparación de toxoides de difteria (DT) está bien documentada. Se puede utilizar cualquier toxoide de difteria adecuado. Por ejemplo, el toxoide de difteria se puede producir mediante la purificación de la toxina a partir de un cultivo de *Corynebacterium diphtheriae*, seguida por destoxificación química, pero de una manera alternativa, se hace

25

mediante la purificación de un análogo recombinante o genéticamente destoxificado de la toxina (por ejemplo, CRM197, u otros mutantes, como se describen en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US 4,709,017, US 5,843,711, US 5,601,827, y US 5,917,017). En una realización, el toxoide de difteria está presente en una cantidad de 5 a 50, de 7 a 30 Lf, o de aproximadamente o exactamente 7.5 Lf ó 25 Lf por dosis de 0.5 mililitros. En una realización adicional, el toxoide de difteria está presente en una dosis baja de menos de 5 Lf, o de 1 a 4 Lf, o de aproximadamente o exactamente 2 Lf por dosis de 0.5 mililitros. En una realización, el toxoide de difteria de la invención puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra realización, el toxoide de difteria de la invención puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una realización adicional, el toxoide de difteria puede ser adsorbido sobre una mezcla de tanto hidróxido de aluminio como fosfato de aluminio.

El antígeno de tétanos de la invención es típicamente un toxoide de tétanos. Los métodos para la preparación de los toxoides de tétanos (TT) son bien conocidos en este campo. En una realización, el toxoide de tétanos se produce mediante la purificación de la toxina a partir de un cultivo de *Clostridium tetani*, seguida por destoxificación química, pero de una manera alternativa, se hace mediante la purificación de un análogo recombinante o genéticamente destoxificado de la toxina (por ejemplo, como se

describe en la Patente Número EP 209281). Se puede utilizar cualquier toxoide de tétanos adecuado. "Toxoide de tétanos" puede abarcar los fragmentos inmunogénicos de la proteína de longitud completa (por ejemplo, el Fragmento C - véase la Patente Europea
5 Número EP 478602). En una realización, el toxoide de tétanos está presente en una cantidad de 2.5 a 30 Lf, de 3 a 20 Lf, de 5 a 15 Lf, o exactamente o aproximadamente de 10 Lf por dosis de 0.5 mililitros. En una realización, el toxoide de tétanos de la invención puede ser absorbido sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio.
10 En otra realización, el toxoide de tétanos de la invención puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una realización adicional, el toxoide de tétanos puede ser adsorbido sobre una mezcla de tanto hidróxido de aluminio como fosfato de aluminio.

15 El componente de tosferina de la invención puede ser ya sea acelular (Pa) en donde se utilizan antígenos de tosferina purificados, o bien de células enteras (Pw), en donde se utiliza tosferina de células enteras muertas como el componente de tosferina. Las células enteras se pueden inactivar mediante varios métodos
20 conocidos, incluyendo los métodos sin mercurio. Estos métodos pueden incluir inactivación por calor (por ejemplo, de 55°C a 65°C, o de 56°C a 60°C, durante 5 a 60 minutos, o durante 10 a 30 minutos, por ejemplo 60°C durante 30 minutos), formaldehído (por ejemplo, al 0.1 por ciento a 37°C, durante 24 horas), glutaraldehído (por
25 ejemplo, al 0.05 por ciento a temperatura ambiente, durante 10

minutos), acetona-I (por ejemplo, tres tratamientos a temperatura ambiente), o acetona II (por ejemplo, tres tratamientos a temperatura ambiente, y un cuarto tratamiento a 37°C) (véanse, por ejemplo, Gupta y colaboradores, 1987, J. Biol. Stand. 15:87; Gupta y
5 colaboradores, 1986, Vaccine, 4:185). Los métodos para la preparación de *Bordetella pertussis* de células enteras muertas (Pw) adecuados para esta invención se dan a conocer en la Publicación Internacional Número WO 93/24148, así como los métodos de formulación adecuados para la producción de vacunas de DT-TT-Pw-
10 HepB. En el pasado se ha utilizado el tiomersal en la preparación de *Bordetella pertussis* de células enteras muertas (véase más adelante). Sin embargo, en una realización, no se utiliza en el proceso de formulación de las vacunas de la presente invención.

Típicamente se utiliza una dosis de Pw de 5 a 50 IOU, de 7 a
15 40 IOU, de 9 a 35 IOU, de 11 a 30 IOU, de 13 a 25 IOU, de 15 a 21 IOU, o alrededor o exactamente 20 IOU.

Las vacunas de Pa acelulares también son bien conocidas, y pueden comprender dos o más antígenos a partir de: toxoide de tosferina (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN),
20 aglutinógenos 2 y 3. En una realización, la vacuna de Pa comprende toxoide de tosferina, hemaglutinina filamentosa, y pertactina. Los kits o las vacunas de la invención pueden comprender el toxoide de tosferina destoxificado mediante un método conocido de tratamiento con formaldehído, o por medio de mutaciones (derivado de toxoide
25 de tosferina. Se ha encontrado que las sustituciones de residuos

dentro de las subunidad S1 de la proteína dan como resultado una proteína que retiene sus propiedades inmunológicas y protectoras de toxoide de tosferina, pero con una toxicidad reducida o ninguna toxicidad (Patente Europea Número EP 322533). Las mutaciones
5 destoxificantes discutidas en las reivindicaciones de la Patente Europea Número EP son ejemplos de los mutantes destoxificados del toxoide de tosferina de la presente invención. Estos mutantes se pueden utilizar en dosis menores de 20 a 25 microgramos.

En una realización, el toxoide de tosferina se utiliza en una
10 cantidad de 2 a 50 microgramos, de 5 a 40 microgramos, de 10 a 30 microgramos, o exactamente o aproximadamente 25 microgramos por dosis de 0.5 mililitros. En otra realización, el toxoide de tosferina se utiliza en una cantidad de exactamente o aproximadamente 2.5 u 8 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

En una realización, la hemaglutinina filamentosa se utiliza en
15 una cantidad de 2 a 50 microgramos, de 5 a 40 microgramos, de 10 a 30 microgramos, o exactamente o aproximadamente 25 microgramos por dosis de 0.5 mililitros. En otra realización, la hemaglutinina filamentosa se utiliza en una cantidad de exactamente o
20 aproximadamente 2.5 u 8 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

En una realización, la pertactina se utiliza en una cantidad de
0.5 a 20 microgramos, de 0.8 a 15 microgramos, de 2 a 10 microgramos, o de exactamente o aproximadamente 8 microgramos por dosis de 0.5 mililitros. En otra realización, la pertactina se utiliza
25 en una cantidad de exactamente o alrededor de 0.8 ó 2.5

microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

En una realización, el componente de tosferina de la invención puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra realización, el componente de tosferina de la invención puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una realización adicional, el componente de tosferina puede ser adsorbido sobre una mezcla de tanto hidróxido de aluminio como fosfato de aluminio. Por ejemplo, en una realización, cuando menos la pertactina es adsorbida sobre hidróxido de aluminio, con el toxoide de tosferina/hemaglutinina filamentosa adsorbidos sobre hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, o una mezcla de ambos.

Antígenos Adicionales

Las formulaciones de vacuna de la invención, que opcionalmente también comprenden DTP (DTPw ó DTPa), pueden comprender adicionalmente uno o más antígenos seleccionados a partir del grupo que consiste en: antígeno superficial de Hepatitis B, antígenos de *Haemophilus influenzae* b, antígenos de *Neisseria meningitidis* A, antígenos de *Neisseria meningitidis* C, antígenos de *Neisseria meningitidis* W-135, antígenos de *Neisseria meningitidis* Y, flictena o antígenos purificados de *Neisseria meningitidis* B, antígenos de hepatitis A, antígenos de *Salmonella typhi*, y RTS,S. Típicamente, se puede utilizar el sacárido capsular, o los antígenos de lipo-oligosacárido de estos patógenos. Los antígenos típicamente estarán presentes en una concentración de cuando menos 1

microgramo/mililitro cada uno, por ejemplo de 1 a 20 microgramos/mililitro, de 2 a 15 microgramos/mililitro, de 2.5 a 10 microgramos/mililitro, de 3 a 8 microgramos/mililitro, o de 4 a 6 microgramos/mililitro. En general, la concentración de cualquier
5 antígeno será suficiente para provocar una respuesta inmune contra este antígeno. Se prefiere que no se remueva la eficacia protectora de los antígenos individuales mediante su combinación, aunque se puede reducir su inmunogenicidad real (por ejemplo, las titulaciones ELISA).

10 Los antígenos adicionales, en una realización de la invención, pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra realización, los antígenos adicionales de la invención pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una realización adicional, los antígenos
15 adicionales pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de tanto hidróxido de aluminio como fosfato de aluminio, o pueden no ser adsorbidos.

Cuando se utiliza un antígeno de sacárido capsular o de lipo-oligosacárido, se puede conjugar con una proteína portadora que
20 comprenda epítomos auxiliares-T, con el objeto de mejorar la inmunogenicidad. La invención también puede comprender "proteínas portadoras" libres.

Como una alternativa a la utilización de antígenos de proteína en las composiciones de la invención, se pueden utilizar ácidos
25 nucleicos que codifiquen el antígeno. Los componentes de proteína

de las composiciones de la invención, por lo tanto, pueden ser reemplazados por ácido nucleico (por ejemplo, ADN, que puede estar en la forma de un plásmido) que codifique la proteína. De una manera similar, las composiciones de la invención pueden comprender proteínas que imiten a los antígenos de sacárido, por ejemplo mimótopos o anticuerpos anti-idiotípicos. Éstos pueden reemplazar a los componentes de sacárido individuales, o pueden complementarlos.

Antígeno de Hepatitis B

La preparación del antígeno superficial de Hepatitis B (HBsAg) está bien documentada. Véanse, por ejemplo, Hartford y colaboradores, 1983, Hartford y colaboradores, 1983, Develop. Biol. Standard 54:125; Gregg y colaboradores, 1987, Biotechnology 5:479, Patente Europea Número EP0226846; y Patente Europea Número EP0299108. Éste se puede preparar como sigue. Un método involucra la purificación del antígeno en una forma de partículas a partir del plasma de los portadores crónicos de Hepatitis B, debido a que se sintetizan grandes cantidades de HBsAg en el hígado, y se liberan hacia la corriente sanguínea durante una infección por el virus de Hepatitis B. Otro método involucra la expresión de la proteína mediante métodos de ADN recombinante. El HBsAg se puede preparar mediante su expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pichia, células de insecto (por ejemplo, Hi5), o células de mamífero. El HBsAg se puede insertar en un plásmido, y se puede controlar su expresión a partir del plásmido

mediante un promotor, tal como el promotor "GAPDH" (a partir del gen de deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato). La levadura se puede cultivar en un medio sintético. Entonces se puede purificar el HBsAg mediante un proceso que involucra pasos tales como precipitación, cromatografía de intercambio de iones, y ultrafiltración. Después de la purificación, el HBsAg se puede someter a diálisis (por ejemplo, con cisteína). El HBsAg se puede utilizar en una forma de partículas.

Como se utiliza en la presente, la expresión "antígeno superficial de Hepatitis B" o "HBsAg" incluye cualquier antígeno HBsAg o fragmento del mismo que exhiba la antigenicidad del antígeno superficial del virus de Hepatitis B. Se entenderá que, en adición a la secuencia de 226 aminoácidos del antígeno HBsAg S (véase Tiollais y colaboradores, 1985, Nature 317:489, y las referencias en el mismo), el HBsAg, como se describe en la presente, si se desea, puede contener toda o parte de una secuencia pre-S, como se describe en las referencias anteriores y en la Patente Europea Número EP0278940. En particular, el HBsAg puede comprender un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos que comprenda los residuos 133-145 seguidos por los residuos 175-400 de la proteína-L del HBsAg en relación con el marco de lectura abierta sobre un virus de Hepatitis B del serotipo ad (este polipéptido es referido como L*; véase la Patente Europea Número EP0414374). El HBsAg, dentro del alcance de la invención, también puede incluir al polipéptido pre-S1-preS2 -S descrito en la

Patente Europea Número EP0198474 (Endotronics), o análogos del mismo, tales como aquéllos descritos en la Patente Europea Número EP0304578 (McCormick y Jones). El HBsAg, como se describe en la presente, también puede referirse a los mutantes, por ejemplo, el

5 "mutante de escape" descrito en la Publicación Internacional Número WO 91/14703 o en la Patente Europea Número EP0511855A1, en especial el HBsAg en donde la sustitución de aminoácido en la posición 145 es hasta arginina a partir de glicina.

El HBsAg puede estar en una forma de partículas. Las

10 partículas pueden comprender, por ejemplo, la proteína S sola, o pueden ser partículas compuestas, por ejemplo, L*, S) en donde L* es como se define anteriormente, y S denota la proteína-S del HBsAg. Esta partícula está convenientemente en la forma en la que se vaya a expresar en levadura.

15 En una realización, el HBsAg es el antígeno utilizado en EngerixB^{MR} (GlaxoSmithKline Biologicals S.A.), el cual se describe adicionalmente en la Publicación Internacional Número WO93/24148.

En una realización, el HBsAg está presente en una cantidad de 5 a 20 microgramos, de 8 a 15 microgramos, o de aproximadamente

20 o exactamente 10 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

El antígeno superficial de Hepatitis B puede ser adsorbido sobre fosfato de aluminio, lo cual se puede hacer antes de mezclarse con los otros componentes (descritos en la Publicación Internacional Número WO93//24148). El componente de Hepatitis B debe estar

25 sustancialmente libre de tiomersal (el método de preparación de

HBsAg sin tiomersal se ha publicado anteriormente en la Patente Europea Número EP EP1307473).

Antígenos de *Haemophilus influenzae b*

5 Las vacunas que comprenden antígenos a partir de *Haemophilus influenzae* tipo B se han descrito en la Publicación Internacional Número WO97/00697. Las vacunas de la invención pueden utilizar cualquier antígeno de *Haemophilus influenzae* tipo B adecuado. El antígeno puede ser un sacárido capsular (PRP) a partir de *Haemophilus influenzae* tipo B conjugado con una proteína portadora (Hib). El sacárido es un polímero de ribosa, ribitol, y fosfato. El antígeno de Hib puede ser adsorbido opcionalmente sobre fosfato de aluminio, como se describe en la Publicación Internacional Número WO97/00697, o puede no ser adsorbido, como se describe en la Publicación Internacional Número WO02/00249, o puede no haberse sometido a un proceso específico de adsorción.

Un antígeno "que no es adsorbido sobre una sal adyuvante de aluminio" significa en la presente, por ejemplo, que no está involucrado un paso de adsorción expreso o dedicado para el antígeno sobre una sal adyuvante de aluminio fresca en el proceso de formulación de la composición.

Hib se puede conjugar con cualquier portador que pueda proporcionar cuando menos un epítipo auxiliar-T (cuyos ejemplos se describen más adelante), y puede ser toxoide de tétanos, toxoide de difteria, CRM-197 (mutante de toxina de difteria), o Proteína D.

25 Hib se puede liofilizar, y se puede reconstituir

extemporáneamente (por ejemplo, con diluyente, comprendiendo de manera opcional otros componentes antigénicos de las vacunas de la invención).

5 En una realización, Hib está presente en una cantidad de 5 a 20 microgramos, de 8 a 15 microgramos, o de aproximadamente o exactamente 10 microgramos de sacárido por dosis de 0.5 mililitros.

En una realización adicional, Hib está presente en una dosis baja (por ejemplo, de 1 a 6 microgramos, de 2 a 4 microgramos, o de alrededor o exactamente 2.5 microgramos de sacárido), como se describe en la Publicación Internacional Número WO02/00249.

Antígenos de *Neisseria meningitidis* tipos A, C, W, ó Y

Las vacunas de la invención pueden comprender además un sacárido capsular de una bacteria seleccionada a partir del grupo que consiste en *N. meningitidis* tipo A (MenA, opcionalmente conjugada con una proteína portadora), *N. meningitidis* tipo C (MenC, 15 opcionalmente conjugada con una proteína portadora), *N. meningitidis* tipo W135 (MenW, opcionalmente conjugada con una proteína portadora), y *N. meningitidis* tipo Y (MenY, opcionalmente conjugada con una proteína portadora).

20 Las vacunas de la invención pueden comprender uno o más antígenos a partir de las diferentes cepas de *N. meningitidis*, que se pueden utilizar solos o en cualquier combinación de 2, 3, ó 4 componentes, como se detalla en seguida:

MenA, MenC, MenW, MenY, ó MenA + MenC, MenA + MenW, 25 MenA + MenY, MenC + MenW, MenC + MenY, MenW + MenY ó MenA

+ MenC + MenW, MenA + MenC + MenY, MenA + MenW + MenY, MenC + MenW + MenY ó MenA + MenC + MenW + MenY.

5 En una realización, los componentes de *Neisseria meningitidis* de la invención pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra realización, los componentes de *Neisseria meningitidis* de la invención pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una realización adicional, los componentes de *Neisseria meningitidis* pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de tanto hidróxido de aluminio como
10 fosfato de aluminio. En una realización, los componentes de *Neisseria meningitidis* pueden no ser adsorbidos sobre un adyuvante, por ejemplo una sal adyuvante de aluminio.

Flictena o antígenos de *Neisseria meningitidis* tipo B

Las vacunas de la invención también pueden comprender un
15 componente MenB, tal como una vesícula o flictena de membrana externa, como se describe en las Publicaciones Internacionales Números WO01/09350, WO03/105890, WO04/014417, ó WO04/014418, o un antígeno de sacárido capsular MenB conjugado (o un derivado del mismo) (véase, por ejemplo, la Publicación
20 Internacional Número WO96/40239), o un lipo-oligosacárido meningocócico L2 ó L3, o L2 y L3, libre o conjugado (de acuerdo con la Publicación Internacional Número WO 2004/014417). En una realización, los componentes MenB de la invención pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de
25 aluminio. En otra realización, los componentes MenB de la invención

pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una realización adicional, los componentes MenB pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de tanto hidróxido de aluminio como fosfato de aluminio. En una realización, los
5 componentes MenB pueden o ser adsorbidos sobre un adyuvante, por ejemplo una sal adyuvante de aluminio.

Antígenos de *Salmonella typhi*

Las vacunas de la invención pueden comprender además el
sacárido Vi a partir de *Salmonella typhi*, el cual puede ser el
10 producto registrado Typherix®, descrito en la Patente Europea
Número EP1107787, o un conjugado del mismo (por ejemplo, con
una proteína portadora, como se describe en la presente). El proceso
de conjugación se puede llevar a cabo como se describe en la
Publicación Internacional Número WO 2007/000343. En una
15 realización, los sacáridos Vi de la invención pueden ser adsorbidos
sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra
realización, los sacáridos Vi de la invención pueden ser adsorbidos
sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una
realización adicional, los sacáridos Vi pueden ser adsorbidos sobre
20 una mezcla de tanto hidróxido de aluminio como fosfato de aluminio.
En una realización, los sacáridos Vi pueden no ser adsorbidos sobre
un adyuvante, por ejemplo, una sal adyuvante de aluminio.

Antígenos de Hepatitis A

El componente que proporciona protección contra hepatitis A
25 puede ser una vacuna de hepatitis A atenuada muerta, por ejemplo el

producto conocido como Havrix^{MR} (marca comercial registrada de GlaxoSmithKline Biologicals S.A.), que es una vacuna atenuada muerta derivada a partir de la cepa HM-175 del virus de hepatitis A (HAV) (véase "Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A" por F. E. Andre y colaboradores, 1980, Prog. Med. Virol. 37:72, y la monografía del producto "Havrix" publicada por SmithKline Beecham Biologicals 1991). Flehming y colaboradores, (1990, Prog. Med. Virol. 37:56) han revisado los aspectos clínicos, la virología, la inmunología, y la epidemiología de la hepatitis A, y han discutido los planteamientos para los desarrollos de vacunas contra esta infección viral común. Como se utiliza en la presente, la expresión "antígeno del virus de hepatitis A" se refiere a cualquier antígeno capaz de estimular al anticuerpo neutralizante para el virus de hepatitis A en seres humanos. En una realización, el antígeno del virus de hepatitis A comprende partículas de virus atenuadas inactivadas, o en otra realización, puede ser una capsida del virus de hepatitis A, o una proteína viral del virus de hepatitis A, que convenientemente se puede obtener mediante tecnología de ADN recombinante. En una realización, el componente de hepatitis A de la invención puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra realización, el componente de hepatitis A de la invención puede ser adsorbido sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una realización adicional, el componente de hepatitis A puede ser adsorbido sobre una mezcla de tanto hidróxido de aluminio como fosfato de aluminio.

Antígenos de Malaria

Las vacunas de la invención pueden comprender además antígenos de malaria. El antígeno de malaria puede ser el RTS,S (proteína híbrida entre CS y HBsAg - descrita en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 6,306,625 y en la Patente Europea Número EP 0614465). En una realización, el RTS,S se puede utilizar en las vacunas de la invención en lugar del HBsAg. También se pueden utilizar otros antígenos de malaria en las vacunas de la invención, incluyendo la proteína CS, RTS, TRAP, proteína de 16kD de B 2992, AMA-1, MSP1, incluyendo opcionalmente CpG (Publicaciones Internacionales Números WO2006/029887, WO98/05355, WO01/00231).

En una realización, los antígenos de malaria de la invención pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. En otra realización, los antígenos de malaria de la invención pueden ser adsorbidos sobre una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. En una realización adicional, los antígenos de malaria pueden ser adsorbidos sobre una mezcla de tanto hidróxido de aluminio como fosfato de aluminio. En una realización, el antígeno de malaria es auxiliado por una emulsión de aceite en agua y/o un derivado de lípido A (tal como MPL) y/o esterol (tal como colesterol), y/o tocol (tal como α -tocoferol). En otra realización, los antígenos de malaria pueden no ser adsorbidos sobre un adyuvante, por ejemplo una sal adyuvante de aluminio.

Conjugados

Los conjugados de sacárido capsular bacteriano de la invención pueden comprender cualquier péptido, polipéptido, o proteína portadora que comprenda cuando menos un epítopo auxiliar-T. Las proteínas portadoras utilizadas se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en: toxoide de tétanos, toxoide de difteria, CRM197, toxina de difteria recombinante (como se describe en cualquiera de las Patentes Números US 4,709,017, WO 93/25210, WO 95/33481, ó WO 00/48638), neumolisina (opcionalmente químicamente destoxificada, o un mutante destoxificado) a partir de *S. pneumoniae* (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 2004/081515, y las referencias referidas en la misma), OMPC a partir de *N. meningitidis* (Patente Europea Número EP 0372501), y proteína D (PD) a partir de *H. influenzae* (Patente Europea Número EP 594610). Otros portadores pueden incluir péptidos sintéticos (Patentes Europeas Números EP 0378881 y EP 0427347), proteínas de choque por calor (Publicaciones Internacionales Números WO 93/17712 y WO 94/03208), proteínas de tosferina (Publicación Internacional Número WO 98/58668 y Patente Europea Número EP 0471177), citoquinas (Publicación Internacional Número WO 91/01146), linfocinas (Publicación Internacional Número WO 91/01146), hormonas (Publicación Internacional Número WO 91/01146), factores de crecimiento (Publicación Internacional Número WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células-T CD4⁺

humanos a partir de diferentes antígenos derivados de patógenos (Falugi y colaboradores, 2001, Eur. J. Immunol. 31:3816), proteína superficial neumocócica PspA (Publicación Internacional Número WO 02/091998), proteínas de absorción de hierro (Publicación Internacional Número WO 01/72337), toxina A ó B a partir de *C. difficile* (Publicación Internacional Número WO 00/61761), PhtD neumocócico (Publicación Internacional Número WO 00/37105), PhtDE neumocócico (por ejemplo, Publicaciones Internacionales Números WO 01/98334 y WO 03/054007), PhtX, etc.

Los sacáridos pueden estar todos sobre el mismo portador, en particular todos los sacáridos a partir de un organismo particular, por ejemplo, los sacáridos MenA, MenC, MenW, y MenY, pueden conjugarse todos con TT, DT, ó CRM-197. Sin embargo, debido al efecto conocido de la supresión del portador, puede ser conveniente que en cada una de las composiciones de la invención, los antígenos de sacárido contenidos en las mismas (antígenos 'n') se conjuguen con más de un portador. Por consiguiente (n-1) de los sacáridos podrían ser llevados (por separado) sobre un tipo de portador, y uno sobre un portador diferente, o (n-2) sobre uno, y 2 sobre dos portadores diferentes, etc. Por ejemplo, en una vacuna que contenga cuatro conjugados de sacárido bacterianos, 1, 2, o los cuatro se podrían conjugar con diferentes portadores). Sin embargo, la proteína D se puede utilizar para diferentes (2, 3, 4, o más) sacáridos en una composición sin un efecto de supresión del portador notorio. Hib puede estar presente como un conjugado de

TT, DT, ó CRM197, y MenA, MenC, MenY, y MenW pueden ser conjugados de TT, DT, CRM197, o PD. Vi puede estar presente como un conjugado de TT, DT, ó CRM197. La proteína D es un portador útil, debido a que proporciona un antígeno adicional que puede proporcionar protección contra *H. influenzae*. En una realización, todos los sacáridos se conjugan con la misma proteína portadora.

Vi se puede conjugar con una proteína portadora, por ejemplo, mediante un método que utiliza la química de condensación de carbodi-imida (por ejemplo, EDAC) (dado que la subunidad de repetición Vi comprende grupos de ácido carboxílico). Esto se podría lograr ya sea mediante: (i) una sola reacción de carbodi-imida entre COOH de Vi y NH₂ de la proteína, o (ii) una doble reacción de carbodi-imida que puede presentarse ya sea entre COOH de Vi y NH₂ de una molécula enlazadora homobifuncional, y COOH de la proteína y NH₂ de la molécula enlazadora homobifuncional, o entre COOH de Vi y NH₂ de la molécula enlazadora heterobifuncional y NH₂ de la proteína y COOH de la molécula enlazadora heterobifuncional.

La conjugación se puede utilizar en conjunto con las proteínas portadoras libres. En una realización, cuando está presente una proteína portadora dada, tanto en forma libre como conjugada, en una composición de la invención, la forma no conjugada no es más del 5 por ciento de la cantidad total de la proteína portadora en la composición como un todo, o en otra realización, está presente en menos del 2 por ciento en peso.

El sacárido se puede enlazar a la proteína portadora mediante cualquier método conocido (por ejemplo, por Likhite, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,372,945, y por Armor y colaboradores, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica
5 Número 4,474,757), con cualquier enlazador adecuado cuando sea necesario.

El sacárido típicamente se activará o se funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede involucrar, por ejemplo, agentes cianilantes, tales como CDAP (tetrafluoro-borato de 1-ciano-
10 dimetil-amino-piridinio) (Publicaciones Internacionales Números WO 95/08348 & WO 96/29094). La reacción de cianilación se puede llevar a cabo bajo condiciones relativamente suaves, lo cual evita la hidrólisis de los sacáridos sensibles al álcali. Esta síntesis permite tener el acoplamiento directo con una proteína portadora. Otras
15 técnicas adecuadas utilizan carbodi-imidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitro-benzoico, N-hidroxi-succinimida, S-NHS, EDC, ó TSTU.

Los enlaces por medio de un grupo enlazador se pueden hacer utilizando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los
20 procedimientos descritos en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US 4,882,317 y US 4,695,624. Un tipo de enlace involucra la aminación reductiva del sacárido, el acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo enlazador de ácido adípico (Patente Europea Número EP 0477508, Porro y
25 colaboradores, 1985, Mol. Immunol. 22:907, Patente Europea

Número EP 0208375), y luego el acoplamiento de una proteína con el otro extremo del grupo enlazador de ácido adípico. Otros enlazadores incluyen B-propionamido (Publicación Internacional Número WO00/10599), nitrofenil-etilamina (Gever y colaboradores, 1979, Med. Microbiol. Immunol. 165:171), haluros de haloacilo (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4,057,685), enlaces glicosídicos (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US 4,673,574; US 4,761,283; US 4,808,700), ácido 6-amino-caproico (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4,459,286), ADH (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4,965,338), las fracciones C4 a C12 (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4,663,160), etc. Como una alternativa a la utilización de un enlazador, se puede utilizar el enlace directo. Los enlaces directos con la proteína pueden comprender la oxidación del sacárido, seguida por aminación reductiva con la proteína, como se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US 4,761,283 y US 4,356,170, o una reacción de CDAP directa.

Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados se pueden separar. Existen muchos métodos adecuados para esta separación, incluyendo cromatografía hidrofóbica, ultra-filtración tangencial, diafiltración, etc. (véase también Lei y colaboradores, 2000, Dev. Biol. (Basilea); 103:259; Publicación Internacional Número WO 00/38711; Patente de los Estados Unidos de

Norteamérica Número US 6,146,902). En una realización, si una vacuna comprende un sacárido dado en la forma tanto libre como conjugada, la forma no conjugada no es más del 20 por ciento en peso de la cantidad total de ese sacárido en la composición como un todo (por ejemplo, ≤ 15 por ciento, ≤ 10 por ciento, ≤ 5 por ciento, ≤ 2 por ciento, ≤ 1 por ciento).

Una cantidad de sacárido que sea capaz de conferir protección a un huésped (una cantidad efectiva) puede ser determinada por la persona experta. En una realización, cada dosis comprenderá de 0.1 a 100 microgramos de sacárido; en otra realización, cada dosis comprenderá de 0.1 a 50 microgramos; en una realización adicional, cada dosis comprenderá de 0.1 a 10 microgramos; en todavía otra realización, cada dosis comprenderá de 1 a 5 microgramos.

Adyuvantes

Las vacunas de la invención pueden incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como una adyuvante adecuado. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, hierro, o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, o pueden ser sacáridos catiónicamente o aniónicamente derivados, polifosfacenos, microesferas biodegradables, monofosforil-lípido A (MPL), derivados de lípido A (por ejemplo, de una toxicidad reducida), MPL 3-O-desacilado, quil A, Saponina, QS21, tocol (Patente Europea Número EP 0382271), adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories,

Detroit, MI), adyuvante Merck 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ), AS-2 (Smith-Kline Beecham, Filadelfia, PA), oligonucleótidos CpG, bioadhesivos y mucoadhesivos, micropartículas, liposomas, formulaciones de éter de polioxietileno, formulaciones de éster de polioxietileno, péptidos de muramilo, o compuestos de imidazoquinolona (por ejemplo, imiquamod y sus homólogos). Los inmunomoduladores humanos adecuados para utilizarse como adyuvantes en la invención incluyen citoquinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), que también se pueden utilizar como adyuvantes.

En una realización de la invención, la composición adyuvante de las formulaciones induce una respuesta inmune predominantemente del tipo TH1. Los altos niveles de citoquinas tipo TH1 (por ejemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2, e IL-12) tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunes mediadas por células a un antígeno administrado. Dentro de una realización, en donde una respuesta es predominantemente del tipo TH1, el nivel de citoquinas del tipo TH1 aumentará hasta un grado mayor que el nivel de citoquinas del tipo TH2. Los niveles de estas citoquinas pueden ser fácilmente evaluados empleando ensayos convencionales. Para una revisión de las familias de citoquinas, véase Mosmann y Coffman, 1989, Ann. Rev. Immunol. 7:145.

De conformidad con lo anterior, los sistemas adyuvantes adecuados que promueven una respuesta predominantemente TH1 incluyen los derivados de lípido A (por ejemplo, de una toxicidad reducida), monofosforil-lípido A (MPL) o un derivado del mismo, en particular el monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), y una combinación de monofosforil-lípido A, opcionalmente monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado junto con una sal de aluminio. Un sistema mejorado involucra la combinación de un monofosforil-lípido A y un derivado de saponina, en particular la combinación de QS21 y 3D-MPL, como se da a conocer en la Publicación Internacional Número WO 94/00153, o una composición menos reactogénica, en donde el QS21 se apaga con colesterol, como se da a conocer en la Publicación Internacional Número WO 96/33739. Una formulación de adyuvante particularmente potente que involucra QS21, 3D-MPL, y tocoferol en una emulsión de aceite en agua, se describe en la Publicación Internacional Número WO 95/17210. La vacuna puede comprender adicionalmente una saponina, la cual puede ser QS21. La formulación también puede comprender una emulsión de aceite en aguay tocoferol (Publicación Internacional Número WO 95/17210). Los oligonucleótidos que contienen CpG no metilados (Publicación Internacional Número WO 96/02555) también son inductores preferenciales de una respuesta de TH1, y son adecuados para utilizarse en la presente invención.

Las vacunas de la invención también pueden comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes de la

invención identificados anteriormente.

Cualquier adyuvante de la invención puede ser adsorbido por, o se puede combinar con, el componente de poliovirus inactivado de la invención.

5 Cuando se hace referencia a hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, la referencia se hace a todos los adyuvantes de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio, como son descritos por Hem y White (Pharm. Biotechnol. 1995; 6:249-276).

10 En una realización, el fosfato de aluminio también puede ser referido como hidroxifosfato de aluminio. En otra realización, el fosfato de aluminio tiene una carga negativa a un pH de 7.4. Típicamente, el punto isoeléctrico (pI) del fosfato de aluminio es de 5 a 7, o de 6 a 7, o de alrededor o exactamente 5. En una realización adicional, el fosfato de aluminio tiene una proporción molar de
15 fosfato:aluminio de 0.3 a 0.9, o de 0.3 a 0.6, o de 0.8 a 0.9.

En una realización, el hidróxido de aluminio tiene una carga positiva a un pH de 7.4. Típicamente, el punto isoeléctrico del hidróxido de aluminio es de 8 a 11, de 9 a 11, de 10 a 11, o de alrededor o exactamente 11.

20 Típicamente, el contenido total de aluminio es de 200 a 1,000 microgramos, de 300 a 900 microgramos, de 400 a 800 microgramos, de 500 a 700 microgramos, o de alrededor o exactamente 630 microgramos de Al^{3+} por dosis de 0.5 mililitros. Éste puede ser todo de hidróxido de aluminio o todo de fosfato de aluminio. De una
25 manea alternativa, el contenido de Al^{3+} puede ser a partir de una

mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio en la siguiente proporción: 1:8-8:1, 1:4-4:1, 3:8-8:3, 1:2-2:1 ó 1:1 de fosfato de aluminio:hidróxido de aluminio. En una realización, se utiliza una proporción de 12:1-4:1, 11:1-5:1, 10:1-6:1, 9:1-7:1, u 8:1 de fosfato de aluminio:hidróxido de aluminio.

Aunque la mayor parte del aluminio es proporcionada por los antígenos previamente adsorbidos antes de mezclarse para formar una vacuna de combinación, se puede agregar algo de aluminio en forma libre durante la formulación de la vacuna de combinación de la invención, por ejemplo antes del paso de ajuste del pH descrito en la presente. Típicamente, el contenido de aluminio libre por dosis de 0.5 mililitros puede ser de 0 a 300 microgramos, de 50 a 250 microgramos, de 75 a 200 microgramos, de 100 a 150 microgramos, o de alrededor o exactamente 115 microgramos de Al^{3+} . El Al^{3+} libre puede ser todo de $\text{Al}(\text{OH})_3$ o todo de AlPO_4 , o una mezcla de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y AlPO_4 , en la siguiente proporción (peso:peso, $\text{Al}^{3+}:\text{Al}^{3+}$): 1:1-1:6, 1:1.1-1:5, 1:1.2-1:4, 1:1.3-1:3, 1:1.4-1:2, por ejemplo 23/92 ó 69/46 ó 6:1-1:1, 5:1-1.1:1, 4:1-1.2:1, 3:1-1.3:1, 2:1-1.4:1, por ejemplo 46/69 ó 92/23.

De una manera alternativa, ciertos componentes de las vacunas de la invención pueden no ser expresamente adsorbidos sobre un adyuvante, en particular de sales de aluminio.

El poliovirus inactivado puede no ser adsorbido o puede ser adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$, o sobre una mezcla de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y AlPO_4 . El toxoide de difteria puede ser adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ó AlPO_4 ; el

toxoide de tétanos puede ser adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ó AlPO_4 , el Pw
 puede ser adsorbido sobre, o se puede mezclar con, AlPO_4 , la
 pertactina puede ser adsorbida sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$; la hemaglutinina
 filamentosa puede ser adsorbida sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$; el toxoide de
 5 tosferina puede ser adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$; HB puede ser
 adsorbido sobre AlPO_4 , Hib puede ser adsorbido sobre AlPO_4 o
 puede no ser adsorbido, Men ACWY pueden ser adsorbidos sobre
 $\text{Al}(\text{OH})_3$ ó AlPO_4 , o pueden no ser adsorbidos, el componente MenB
 puede ser adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ó AlPO_4 , o puede no ser
 10 adsorbido; Vi puede ser adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ó AlPO_4 , o puede
 no ser adsorbido; HepA puede ser adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ó AlPO_4 .

Los antígenos que son previamente adsorbidos sobre una sal
 de aluminio, se pueden adsorber previamente de una manera
 individual antes de mezclarse. En otra realización, una mezcla de
 15 antígenos puede ser previamente adsorbida antes de mezclarse con
 los adyuvantes adicionales. En una realización, el poliovirus
 inactivado puede ser adsorbido por separado o como una mezcla de
 poliovirus inactivado tipos 1, 2, y 3, o cuando se mezcla con los
 componentes D y T adsorbidos.

20 El significado de "antígeno adsorbido" se toma, por ejemplo,
 para significar más del 20 por ciento, 30 por ciento, 40 por ciento, 50
 por ciento, 60 por ciento, 70 por ciento, 80 por ciento, ó 90 por
 ciento adsorbido.

25 El significado de los términos "fosfato de aluminio" e "hidróxido
 de aluminio", como se utilizan en la presente, incluye todas las

formas de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio que son adecuadas para auxiliares de vacunas. Por ejemplo, el fosfato de aluminio puede ser un precipitado de fosfato de aluminio insoluble (amorfo, semi-cristalino, o cristalino), el cual se puede preparar 5 opcionalmente, pero no exclusivamente, mediante la mezcla de sales de aluminio y sales de ácido fosfórico solubles. El "hidróxido de aluminio" puede ser un precipitado de hidróxido de aluminio soluble (amorfo, semi-cristalino, o cristalino), el cual se puede preparar 10 opcionalmente, pero no exclusivamente, mediante la neutralización de una solución de sales de aluminio. Son particularmente adecuadas las diferentes formas de geles de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio disponibles en las fuentes comerciales, por ejemplo, Alhydrogel (hidróxido de aluminio, suspensión al 3 por ciento en agua), y Adjuphos (fosfato de aluminio, suspensión al 2 por 15 ciento en suero) suministrados por Brenntag Biosector (Dinamarca).

Componentes no inmunológicos de las vacunas de la invención

Las vacunas de la invención típicamente, en adición a los componentes antigénicos y adyuvantes mencionados anteriormente, comprenden uno o más "vehículos o excipientes farmacéuticamente 20 aceptables", los cuales induzcan cualquier excipiente que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que reciba la composición. Los excipientes adecuados son típicamente macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, sacáridos, poli-ácidos lácticos, poli-ácidos 25 glicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos,

sacarosa (Paoletti y colaboradores, 2001, Vaccine, 19:2118), trehalosa (Publicación Internacional Número WO 00/56365), agregados de lactosa y lípido (tales como gotitas de aceite o liposomas). Estos vehículos son bien conocidos por los expertos
5 ordinarios en este campo. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, suero, glicerol, etc. Adicionalmente, puede haber presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias reguladoras del pH, y similares. Un vehículo típico es el suero fisiológico regulado con
10 fosfato estéril, sin pirógeno. Está disponible una discusión completa de los excipientes farmacéuticamente aceptables en la referencia: Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, ISBN:0683306472.

Las composiciones de la invención se pueden liofilizar, o
15 pueden estar en una forma acuosa, es decir, como soluciones o suspensiones. Las formulaciones líquidas de este tipo permiten que las composiciones se administren directamente desde su forma empacada, sin la necesidad de reconstitución en un medio acuoso, y por lo tanto, son ideales para inyección. Las composiciones se
20 pueden presentar en frascos, o se pueden presentar en jeringas llenadas listas para usarse. Las jeringas se pueden suministrar con o sin agujas. Una jeringa incluirá una sola dosis de la composición, mientras que un frasco puede incluir una sola dosis o múltiples dosis (por ejemplo, dos dosis). En una realización, la dosis es para un ser
25 humano. En una realización adicional, la dosis es para un humano

adulto, adolescente, niño, bebé, o de menos de un año de edad, y se puede administrar mediante inyección.

Las vacunas líquidas de la invención también son adecuadas para reconstituir otras vacunas a partir de una forma liofilizada.

5 Cuando se va a utilizar una vacuna para la reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit, el cual puede comprender dos frascos, o puede comprender una jeringa llenada lista para usarse y un frasco, utilizándose el contenido de la jeringa para reconstituir el contenido del frasco antes de la inyección.

10 Las vacunas de la invención se pueden empacar en una forma de dosis unitaria o en una forma de múltiples dosis (por ejemplo, dos dosis). Para las formas de múltiples dosis, se prefieren los frascos en lugar de las jeringas previamente llenadas. Los volúmenes de dosificación efectivos se pueden establecer rutinariamente, pero una
15 dosis típica de la composición para inyección para seres humanos, tiene un volumen de 0.5 mililitros.

En una realización, las vacunas de la invención tienen un pH de entre 6.0 y 8.0; en otra realización, las vacunas de la invención tienen un pH de entre 6.3 y 6.9, por ejemplo de 6.6 ± 0.2 . Las
20 vacunas se pueden regular a este pH. Se puede mantener un pH estable mediante el uso de un regulador. Si una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se puede utilizar un regulador de histidina (Publicación Internacional Número WO03/009869). La composición debe ser estéril y/o debe estar
25 exenta de pirógeno.

Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Las vacunas de la invención pueden incluir un antimicrobiano, en particular cuando se empaquen en un formato de múltiples dosis.

5 Se debe evitar el tiomersal, debido a que éste conduce a una pérdida de potencia del componente de poliovirus inactivado. Se pueden utilizar otros antimicrobianos, tales como 2-fenoxi-etanol o parabenos (metil-, etil-, o propil-parabenos). De preferencia está presente cualquier conservador en niveles bajos. El conservador se
10 puede agregar exógenamente, y/o puede ser un componente de los antígenos a granel que se mezclen para formar la composición (por ejemplo, presente como un conservador en los antígenos de tosferina).

En una realización, las vacunas de la invención están libres de
15 tiomersal o sustancialmente libres de tiomersal. "Libres de tiomersal" o "sustancialmente libres de tiomersal" significa que no hay suficiente tiomersal presente en la formulación final para impactar negativamente la potencia del componente de poliovirus inactivado. Por ejemplo, si se utiliza tiomersal durante el proceso de purificación
20 del antígeno superficial de Pw o de Hepatitis B, se debe remover sustancialmente antes de mezclarse con el poliovirus inactivado. El contenido de tiomersal en la vacuna final debe ser menor de 0.025 microgramos/microgramo de proteína, de 0.02 microgramos/-microgramo de proteína, de 0.01 microgramos/microgramo de
25 proteína, o de 0.001 microgramos/microgramo de proteína, por

ejemplo de 0 microgramos/microgramo de proteína. En una realización, no se agrega tiomersal ni se utiliza en la purificación de cualquiera de los componentes. Véase, por ejemplo, la Patente Europea Número EP1307473 para la Hepatitis B, y véase
5 anteriormente para los procesos de Pw en donde se logra la aniquilación sin la presencia de tiomersal.

Las vacunas de la invención pueden comprender detergente, por ejemplo un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes están en general presentes en bajos niveles, por
10 ejemplo, del <0.01 por ciento.

Las vacunas de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. La composición puede comprender cloruro de sodio. En una realización, la concentración del cloruro de sodio en la composición de la invención está en el
15 intervalo de 0.1 a 100 miligramos/mililitro (por ejemplo, de 1 a 50 miligramos/mililitro, de 2 a 20 miligramos/mililitro, de 5 a 15 miligramos/mililitro), y en una realización adicional, la concentración del cloruro de sodio es de 10 ± 2 miligramos/mililitro de NaCl, por ejemplo de aproximadamente 9 miligramos/mililitro.

20 Las vacunas de la invención generalmente incluirán un regulador del pH. Es típico un regulador de fosfato o de histidina.

Las vacunas de la invención pueden incluir iones de fosfato libres en solución (por ejemplo, mediante el uso de un regulador de fosfato), con el objeto de favorecer la no adsorción de los antígenos.
25 La concentración de los iones de fosfato libres en la composición de

la invención, en una realización, es de entre 0.1 y 10.0 mM, o en otra realización es de entre 1 y 5 mM, o en una realización adicional es de aproximadamente 2.5 mM.

Propiedades de las vacunas de la invención

5

En una realización, las vacunas de la invención se formulan como una vacuna para su administración *in vivo* al huésped, de tal manera que los componentes individuales de la composición se formulan de tal manera que la inmunogenicidad de los componentes individuales no es sustancialmente perjudicada por otros componentes individuales de la composición. Mediante "no es sustancialmente perjudicada", se pretende significar que, después de la inmunización, se obtiene una titulación de anticuerpo contra cada componente que es mayor del 60 por ciento, del 70 por ciento, del 80 por ciento, o del 90 por ciento, o es del 95 al 100 por ciento de la titulación obtenida cuando se administra el antígeno en aislamiento. Por consiguiente, en las realizaciones preferidas, no se presenta un efecto (significativamente) perjudicial para los otros componentes (en términos de eficacia protectora) en la combinación, comparándose con su administración en aislamiento.

10

15

20

Formulaciones de vacunas

25

En una realización, las vacunas de la invención se formulan como una vacuna para su administración *in vivo* al huésped, de tal manera que confieran una titulación de anticuerpo superior al criterio para la seroprotección para cada componente antigénico, para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Ésta es una prueba

importante en la evaluación de la eficacia de una vacuna a través de toda la población. Los antígenos con una titulación de anticuerpo asociada arriba de la cual se considera que un huésped se seroconvierte contra el antígeno, son bien conocidos, y estas titulaciones son publicadas por organizaciones tales como la Organización Mundial de la Salud. En una realización, se seroconvierte más del 80 por ciento de una muestra de sujetos estadísticamente significativa; en otra realización, se seroconvierte más del 90 por ciento de una muestra de sujetos estadísticamente significativa; en una realización adicional, se seroconvierte más del 93 por ciento de una muestra de sujetos estadísticamente significativa; y en todavía otra realización, se seroconvierte del 96 al 100 por ciento de una muestra de sujetos estadísticamente significativa.

La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induzca una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en las vacunas típicas. Esta cantidad variará dependiendo de cuáles inmunógenos específicos sean empleados. En términos generales, se espera que cada dosis comprenderá de 1 a 1,000 microgramos del inmunógeno total, o de 1 a 100 microgramos, o de 1 a 40 microgramos, o de 1 a 5 microgramos. Se puede aseverar una cantidad óptima para una vacuna particular mediante estudios que involucren la observación de las titulaciones de anticuerpos y de otras respuestas en los sujetos. Un curso de vacunación primaria puede incluir de dos a tres

dosis de vacuna, dadas con una separación de 1 a 2 meses, por ejemplo, siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para la inmunización con DTP (es decir, en el primer año de vida). Pueden seguir dosis de refuerzo en los segundo y/o
5 siguientes años de vida.

Potencia de polio medida mediante la prueba de seroneutralización en ratas.

Para los propósitos de la invención, se debe llevar a cabo el ensayo para la evaluación cuantitativa de la potencia de la vacuna
10 del poliovirus inactivado de las vacunas que contengan poliovirus inactivado de la invención, utilizando una sola dosis de vacuna, y esto se debe hacer mediante la determinación de la proporción de la titulación media geométrica de la vacuna de prueba (GMT) a la
titulación media geométrica de la vacuna de referencia, y se reporta
15 como la respuesta relativa (RR) o la potencia relativa (RP). La titulación media geométrica de la vacuna de referencia puede ser la titulación media geométrica obtenida con cualquier vacuna de poliovirus inactivado que comprenda 40-8-32 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipos 1-2-3, respectivamente, y puede ser la
20 titulación media geométrica obtenida con la vacuna conocida Poliorix®. Típicamente, la prueba de potencia relativa se lleva a cabo como sigue:

Se determina la potencia de poliovirus tipos 1, 2, y 3 en ratas, mediante seroneutralización:

25 Los grupos de 10 ratas sanas (Sprague-Dawley (OFA), o

107

cualquier raza validada de antemano) se inoculan intramuscularmente con diluciones (1/1.25; 1/3.125; 1/7.81) de las muestras de prueba o del material de referencia en suero regulador de fosfato. Si es necesario, se puede extender el intervalo de dilución hasta cuatro diluciones mediante la inoculación de vacuna no diluida, y las tres diluciones previamente mencionadas. Se utilizan 10 ratas inoculadas con el diluyente como controles negativos. Se observa a las ratas una vez a la semana para detectar cualquier reacción anormal. De 20 a 22 días después de la inoculación, cada animal se anestesia profundamente, y se sangra, y se recolecta el suero para analizarse mediante la prueba de seroneutralización.

Para la prueba de seroneutralización, los sueros se inactivan mediante incubación a 56°C durante 30 minutos en un baño de agua. Se preparan tres series de dilución de los sueros, una para cada tipo de polio, en microplacas, utilizando el medio de dilución apropiado. Las placas se almacenan a +4°C.

Para los tres tipos de virus de polio, se agrega una cantidad previamente determinada del virus (de 30 a 300 CCID₅₀) a las diluciones de sueros. Las tres suspensiones de virus se diluyen tomando en cuenta sus titulaciones respectivas. La dilución final se denomina como la "dilución de trabajo". Cada dilución de trabajo se agrega a las microplacas correspondientes. Luego las placas se sellan y se incuban a 37°C $\pm$ 1°C durante 16 horas. Entonces se agregan las células HEP-2, y las microplacas se incuban a 37°C $\pm$

1°C durante 7 días. El efecto citopatogénico (CPE) del virus se lee utilizando un microscopio invertido después de la coloración con azul Coomassie. La presencia de los anticuerpos contra la poliomielitis inhibe el crecimiento del virus y la aparición del efecto citopatogénico correspondiente. Las titulaciones contra el virus de polio (tipo 1, 2, y 3) corresponden al recíproco de la última dilución sin ningún efecto citopatogénico. En cada grupo, se registran los animales con anticuerpos neutralizantes, y se determina la titulación de anticuerpos de cada muestra de suero para los diferentes tipos de poliovirus. La titulación del anticuerpo neutralizante se expresa como el $\log_2$ del inverso de la dilución más alta de la muestra de suero que inhibe totalmente el efecto citopatogénico del poliovirus en las células Hep-2.

También se determina, para cada grupo de ratas, la titulación media geométrica por dilución (GMT) y por tipo de virus.

Empaque de las vacunas de la invención

Las vacunas de la invención se pueden empaquetar en diferentes tipos de recipientes, por ejemplo, en frascos, en jeringas, etc. Un frasco de múltiples dosis típicamente comprenderá una compuerta de plástico re-sellable a través de la cual se pueda insertar una aguja estéril para remover una dosis de vacuna, que se vuelve a sellar una vez que se ha removido la aguja.

La vacuna se puede suministrar en diferentes recipientes (por ejemplo, dos o tres). El contenido de los recipientes se puede mezclar extemporáneamente antes de administrarse a un huésped en

una sola inyección, o se puede administrar de una manera concomitante en diferentes sitios. La dosis de la vacuna o de cada vacuna si se administra un kit de una manera concomitante (en dos o más recipientes) será típicamente de 0.5 mililitros.

5 En una realización de este aspecto de la invención, se proporciona un kit que comprende dos vacunas multivalentes para conferir protección en un huésped contra la enfermedad provocada por poliovirus, *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, y opcionalmente uno o más de
10 Hepatitis B, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Neisseria meningitidis* tipo B, *Salmonella typhi*, Hepatitis A, ó Malaria.

El kit comprende un primer recipiente que comprende:

- 15 (1) (a) el poliovirus inactivado (IPV) de la invención,
 (b) toxóide de difteria (DT ó D) (véase anteriormente),
 (c) toxóide de tétanos (TT ó T) (véase anteriormente),
 (d) *Bordetella pertussis* de células enteras muertas (Pw), o dos o más componentes de tosferina acelulares (Pa) (véase
20 anteriormente),
 (e) opcionalmente antígeno superficial de Hepatitis B (HepB ó HB) (véase anteriormente),
 (f) opcionalmente un conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B (Hib) (véase
25 anteriormente),

(g) opcionalmente cualquiera o ambos conjugados de una proteína portadora y un sacárido capsular de un *N. meningitidis* tipo A (MenA) o *N. meningitidis* tipo C (MenC) (véase anteriormente), y

5 un segundo recipiente que comprende:

(2A) (a) conjugados de una proteína portadora y un sacárido capsular de *N. meningitidis* tipo A (MenA), *N. meningitidis* tipo C (MenC), *N. meningitidis* tipo W (MenW), y/o *N. meningitidis* tipo Y (MenY) (véase anteriormente para las diferentes combinaciones de sacáridos Men de la invención), y

(b) opcionalmente un conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B (Hib); o

(2B) (a) un conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B (Hib), y

15 (b) opcionalmente un conjugado de una proteína portadora y el sacárido Vi de *Salmonella typhi*.

El kit puede comprender opcionalmente un tercer recipiente que comprende:

20 (3) (a) opcionalmente el antígeno superficial de Hepatitis B;

(b) opcionalmente un conjugado de una proteína portadora y el sacárido Vi de *Salmonella typhi*.

Los recipientes pueden en cualquier caso comprender adicionalmente antígenos de HepA y/o antígenos de MenB y/o RTS,S y/o antígenos de *Streptococcus pneumonia*.

En cualquier caso, no debe estar presente el mismo antígeno en ambos recipientes.

En una realización, el primer recipiente tiene, en adición a los componentes a), b), c), d), también los componentes e), f), g), e)+f),
5 e)+g), f)+g) ó e)+f)+g).

En una realización, la vacuna del primer recipiente puede ser líquida, y la vacuna del segundo recipiente puede ser líquida o puede estar liofilizada (por ejemplo, en la presencia de un recipiente estabilizante conocido, tal como sacarosa o trehalosa).

10 Los recipientes del kit se pueden empacar por separado, u opcionalmente, se pueden empacar juntos. En una realización, el kit se proporciona con una lista de instrucciones para la administración de las vacunas en los dos o más recipientes.

En una realización, cuando un recipiente de un kit contiene
15 cierto conjugado de sacárido, el mismo conjugado no está presente en los otros recipientes del kit.

Los inventores creen que un kit proporcionado de la manera anterior puede presentar convenientemente los diferentes antígenos ante el sistema inmune de un huésped de una manera óptima. El kit
20 puede proporcionar a un practicante médico un método óptimo para inmunizar a un huésped con una o más de las siguientes ventajas: eficacia protectora para todos los antígenos, reactogenicidad mínima, interferencia mínima de supresión del portador, interferencia mínima de adyuvante/antígeno, o interferencia mínima de
25 antígeno/antígeno. De esta manera, se pueden alcanzar estas metas

con el número mínimo (2) de administraciones, presentándose opcionalmente en la misma cita al practicante.

En una realización, las vacunas de los primero y segundo recipientes se administran de una manera concomitante en diferentes sitios (como se describe más adelante bajo "administración de las vacunas de la invención"), y en una realización alternativa, los inventores prevén que el contenido de los primero y segundo recipientes se pueda mezclar (opcionalmente de una manera extemporánea) antes de su administración como una sola vacuna.

10 **Preparación de las vacunas de la invención**

La presente invención también proporciona un método para producir una formulación de vacuna, el cual comprende el paso de mezclar los componentes de la vacuna junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 En una realización de la presente invención, se proporciona una vacuna como se describe en la presente, para utilizarse en un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por la infección por poliovirus, y opcionalmente por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus de Hepatitis B, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Salmonella typhi*, ó Hepatitis A.

25 En otra realización de la invención, se proporciona un uso de las vacunas de la invención, en la fabricación de un medicamento

para el tratamiento o la prevención de las enfermedades causadas por la infección por poliovirus, y opcionalmente por *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus de Hepatitis B, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* tipo A, 5 *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Salmonella typhi*, ó Hepatitis A.

Adicionalmente, también se proporciona un método para inmunizar a un huésped humano contra la enfermedad causada por el poliovirus, y opcionalmente por *Bordetella pertussis*, *Clostridium* 10 *tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus de Hepatitis B, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Salmonella typhi*, ó Hepatitis A, cuyo método comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la 15 vacuna de la invención.

La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induzca una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en las vacunas típicas. Esta cantidad variará dependiendo de cuál inmunógeno específico se 20 emplee, y de cómo se presente. En una realización, cada dosis comprenderá de 0.1 a 100 microgramos de sacárido; en otra realización, cada dosis comprenderá de 0.1 a 50 microgramos; en una realización adicional, cada dosis comprenderá de 0.1 a 10 microgramos; y en todavía otra realización, cada dosis comprenderá 25 de 1 a 5 microgramos de sacárido.

En una realización, el contenido de antígenos de proteína en la vacuna estará en el intervalo de 1 a 100 microgramos; en otra realización, el contenido de antígenos de proteína en las vacunas estará en el intervalo de 5 a 50 microgramos; en una realización
5 adicional, el contenido de los antígenos de proteína en las vacunas estará en el intervalo de 5 a 25 microgramos.

La preparación de vacunas se describe en general en Vaccine Design ["The subunit and adjuvant approach" (Editores Powell M. F. y Newman M. J.) (1995) Plenum Press, Nueva York]. La
10 encapsulación dentro de liposomas es descrita por Fullerton, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,235,877. La conjugación de las proteínas con las macromoléculas se da a conocer, por ejemplo, en Likhite, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,372,945, y en Armor y colaboradores,
15 Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,474,757. El uso de Quil A es dado a conocer por Dalsgaard y colaboradores, 1977, Acta Vet Scand. 18:349. El 3D-MPL está disponible en Ribi Immunochem, EUA, y se da a conocer en la Solicitud de Patente Británica Número 2220211 y en la Patente de los Estados Unidos de
20 Norteamérica Número 4,912,094. El QS21 se da a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,057,540.

En una realización adicional de la invención, se proporciona una vacuna multivalente que comprende el poliovirus inactivado (IPV) de la invención, y opcionalmente *Bordetella pertussis* de
25 células enteras muertas (Pw), toxoide de tétanos (TT), toxoide de

difteria (DT), un conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B (Hib - opcionalmente conjugado con TT, DT, ó CRM197), en donde la cantidad del conjugado por dosis de 0.5 mililitros de la vacuna a granel es de 1 a 8 microgramos, y la
5 inmunogenicidad del conjugado es equivalente o mejor sobre las composiciones que comprenden mayores cantidades del conjugado. Opcionalmente, también se puede incluir en el antígeno superficial de Hepatitis B.

En una realización, la cantidad de conjugado por dosis de 0.5
10 mililitros de vacuna a granel es menor de 10 microgramos (de sacárido en el conjugado); en otra realización, la cantidad de conjugado es de 1 a 7 microgramos; en otra realización, la cantidad de conjugado es de 2 a 6 microgramos; o en una realización adicional es de aproximadamente 2.5, 3, 4, ó 5 microgramos.

15 Se apreciará que ciertos componentes, por ejemplo los componentes de DTPw, se pueden combinar por separado antes de agregar el HBsAg adsorbido u otros componentes.

También se proporciona un método para la elaboración de las vacunas de la invención, el cual comprende el paso de mezclar el
20 poliovirus inactivado tipo 1, el poliovirus inactivado tipo 2, y/o el poliovirus inactivado tipo 3 con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un proceso típico para la preparación de la vacuna a granel de la invención con antígenos adicionales agregará los componentes del poliovirus inactivado a una mezcla de los
25 componentes D y T, es decir, los componentes DT se mezclan con

los componentes del poliovirus inactivado. Este orden de mezcla permite que se ajuste la concentración iónica y/o el pH de la composición (por ejemplo, pH <7) antes de la adición de los componentes de Pa ó Pw. Típicamente, si se incluye en la

5 composición, primero se agrega el HB previamente adsorbido sobre AlPO_4 , seguido por la adición del DT previamente adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ó AlPO_4 , seguido por la adición del TT previamente adsorbido sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$ ó AlPO_4 , seguido por la adición del poliovirus inactivado opcionalmente previamente adsorbido sobre

10 $\text{Al}(\text{OH})_3$, antes del ajuste del pH, por ejemplo, hasta un pH de 5.9 a 7.2, o hasta un pH de 6 a 7, o hasta un pH de 6.2 a 6.8, o hasta un pH de 6.4 a 6.6, y entonces se puede hacer la adición del Pw previamente adsorbido sobre AlPO_4 . Opcionalmente, los antígenos Hib, Vi, MenA, MenC, MenW, MenY, MenB y/o HepA, se pueden

15 agregar en cualquier punto de este proceso. En una realización, los antígenos Hib, Vi, MenA, MenC, MenW, MenY, MenB y/o HepA se agregan antes del ajuste del pH. En una realización, uno o más antígenos de la invención son adsorbidos sobre fosfato de aluminio o sobre hidróxido de aluminio, o sobre una mezcla de ambos. En otra

20 realización, los antígenos de la invención se mezclan con un excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición de vacuna de la invención se puede preparar en el siguiente orden: se agrega el HBsAg previamente adsorbido, seguido por el toxoide de difteria

25 previamente adsorbido, seguido por el toxoide de tétanos

previamente adsorbido y el poliovirus inactivado, y entonces se ajusta el pH hasta aproximadamente 6.5 antes de agregar el Pw previamente adsorbido.

5 En otra realización, la composición de vacuna de la invención se puede preparar en el siguiente orden: se agrega el toxoide de tétanos previamente adsorbido, seguido por el poliovirus inactivado, seguido por el HBsAg previamente adsorbido, seguido por el toxoide de difteria previamente adsorbido, entonces se ajusta el pH hasta aproximadamente 6.5 antes de agregar el Pw previamente adsorbido.

10 En general, las composiciones de vacuna combinadas de acuerdo con cualquier aspecto de la invención se pueden preparar como sigue: el poliovirus inactivado, DTPw, HepB, MenA, MenC, MenW, MenY, MenB, Vi, Hepatitis A, u otros componentes, se adsorben previamente sobre un adyuvante adecuado, en especial hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, o una mezcla de ambos. Después de dar tiempo para tener una adsorción completa y estable de los componentes respectivos, los diferentes componentes se combinan bajo condiciones apropiadas. Los conjugados de Hib, Vi, MenA, MenC, MenW y/o MenY pueden o no ser adsorbidos sobre la
20 sal adyuvante de aluminio antes de mezclarse con la vacuna de DTPw.

En una realización, las vacunas de la invención se preparan entre 15°C y 30°C (por ejemplo, entre 19°C y 27°C, o a $23 \pm 4^\circ\text{C}$).

Administración de las vacunas de la invención

25 La invención proporciona un método para elevar una respuesta

inmune en un mamífero, el cual comprende el paso de administrar una cantidad efectiva de una vacuna de la invención. Las vacunas se pueden administrar profilácticamente (es decir, para prevenir la infección). La respuesta inmune de preferencia es protectora, y
5 preferiblemente involucra anticuerpos. El método puede presentar una respuesta de refuerzo.

En seguida de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo (subsiguientes) adecuadamente separadas. El tratamiento de dosificación puede ser
10 un programa de una sola dosis o un programa de múltiples dosis. Se pueden utilizar múltiples dosis en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. Un programa de dosis primaria, el cual puede ser en el primer año de vida, puede ser seguido por un programa de dosis de refuerzo. El
15 tiempo adecuado entre las dosis primarias (por ejemplo, entre 4 y 16 semanas), y entre las dosis primarias y de refuerzo, se puede determinar rutinariamente.

En una realización, el mamífero es un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano de preferencia es un
20 niño (por ejemplo, un bebé o un infante), o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano de preferencia es un adulto. Una vacuna pretendida para niños también se puede administrar a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

25 Las preparaciones de vacuna de la presente invención se

pueden utilizar para proteger o tratar a un mamífero susceptible a infección, por medio de la administración de esta vacuna directamente a un paciente. El suministro directo se puede llevar a cabo mediante administración parenteral (intramuscularmente, intraperitonealmente, intradérmicamente, subcutáneamente, intravenosamente, o al espacio intersticial de un tejido); o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar, u otra administración a las mucosas. En una realización, la administración es mediante inyección intramuscular en el muslo o en el antebrazo. La inyección puede ser por medio de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero de una manera alternativa, se puede utilizar una inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0.5 mililitros.

Las infecciones bacterianas afectan a diferentes áreas del cuerpo, y de esta manera, las composiciones de la invención se pueden preparar en diferentes formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. La composición se puede preparar para administración pulmonar, por ejemplo como un inhalador, utilizando un polvo fino o aerosol. La composición se puede preparar como un supositorio o un pesario. La composición se puede preparar para administración nasal, aural, u ocular, por ejemplo, como aerosol, gotas, gel, o polvo (véanse, por ejemplo, Almeida y Alpar, 1996, J. Drug Targeting, 3:455; Bergquist y colaboradores, 1998, APMIS, 106:800). Se ha reportado la

administración intranasal de éxito de las vacunas de DTP (Ryan y colaboradores, 1999, Infect. Immun., 67:6270; Nagai y colaboradores, 2001, Vaccine, 19:4824).

5 En una realización, las vacunas de los primero y segundo (y
tercero cuando sea aplicable) recipientes, se administran de una
manera concomitante en diferentes sitios, y en una realización
alternativa, los inventores prevén que el contenido de los primero y
segundo recipientes se pueda mezclar (opcionalmente de una
manera extemporánea) antes de su administración como una sola
10 vacuna.

La invención se puede utilizar para provocar una inmunidad
sistémica y/o mucosa.

Una manera de verificar la eficacia del tratamiento terapéutico
involucra monitorear la infección bacteriana después de la
15 administración de la composición de la invención. Una manera de
verificar la eficacia del tratamiento profiláctico involucra monitorear
las respuestas inmunes contra los antígenos después de la
administración de la composición. La inmunogenicidad de las
composiciones de la invención se puede determinar mediante su
20 administración a los sujetos de prueba (por ejemplo, niños de 12 a
16 meses de edad, o modelos animales - Publicación Internacional
Número WO 01/30390), y luego se determinan los parámetros
inmunológicos estándares. Estas respuestas inmunes en general se
determinarán alrededor de 4 semanas después de la administración
25 de la composición, y se compararán con los valores determinados

antes de la administración de la composición. En lugar de evaluar la eficacia protectora real en los pacientes, también se conocen modelos animales e *in vitro* convencionales, y se correlaciona la protección para evaluar la eficacia de las vacunas de DTP.

5 Los términos "que comprende", "comprenden", y "comprende" en la presente, son pretendidos por los inventores como opcionalmente sustituibles con los términos "que consisten en", "consisten en", y "consiste en", respectivamente, en cada caso. Esto no cambia el significado normal de estos términos, y solamente se
10 pretende proporcionar una base para la sustitución, y no hacerlos equivalentes en su significado.

Todas las referencias y publicaciones citadas se incorporan como referencia a la presente.

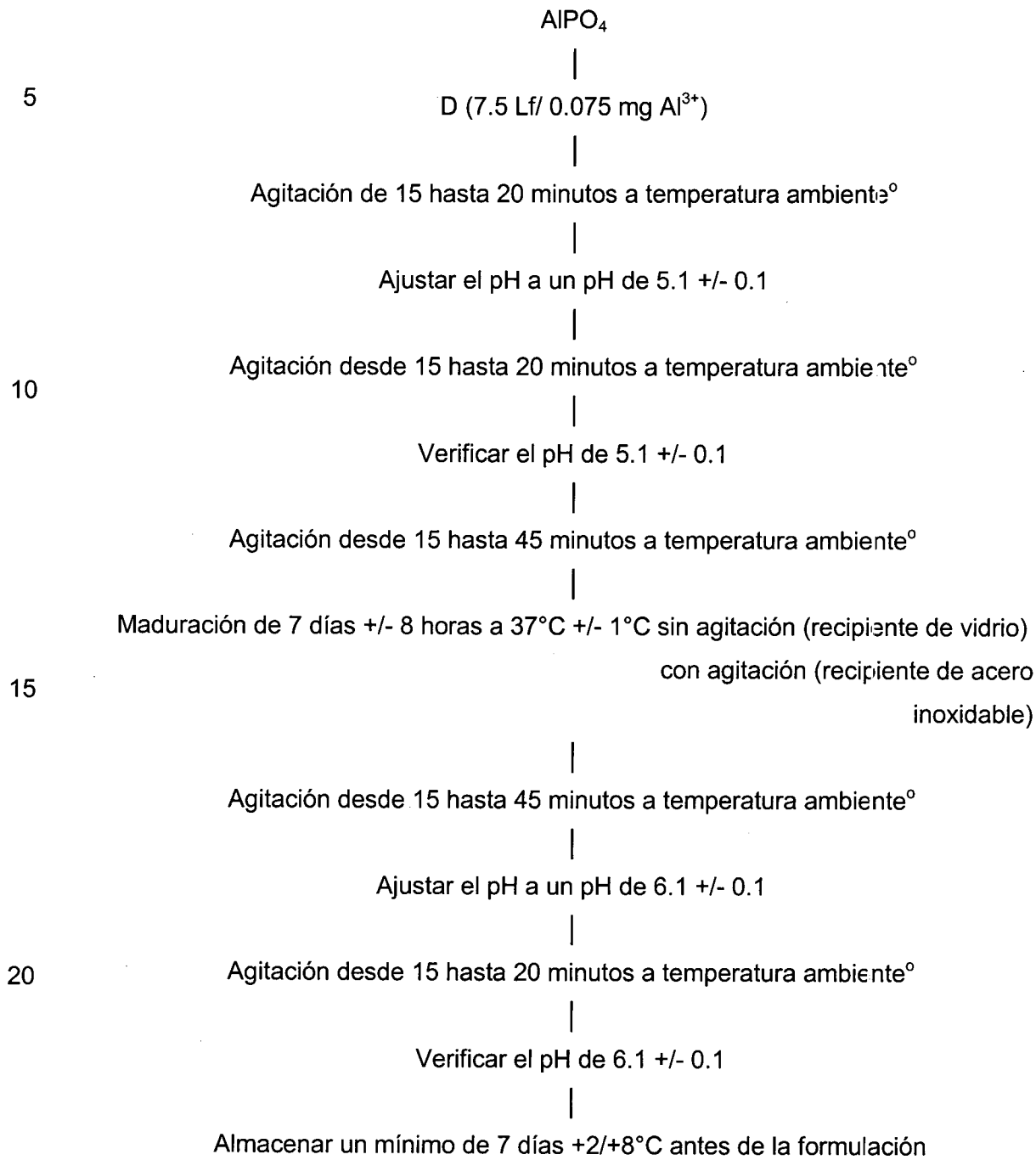
15 **EJEMPLOS**

Los Ejemplos se proporcionan exclusivamente para propósitos de ilustración, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Pruebas sobre las formulaciones de poliovirus inactivado de dosis baja.

20 Para todas las formulaciones del Ejemplo 1, los antígenos son adsorbidos mediante la adición de la sal de aluminio antes de la formulación, excepto el poliovirus inactivado, el cual se agrega sin adsorción.

25 Las siguientes tablas presentan el método de adsorción para D, T, Pw, y HBsAg.



117

Tabla 1

Método de producción para adsorción de toxoide de difteria

COMPOSICIÓN FINAL por dosis	
Difteria	7.5 Lf (+/- 420 Lf/ml)
Al ³⁺	0.075 mg
NaCl	150 mM
pH	6.1 +/- 0.1
Volumen	aproximadamente 18 µl

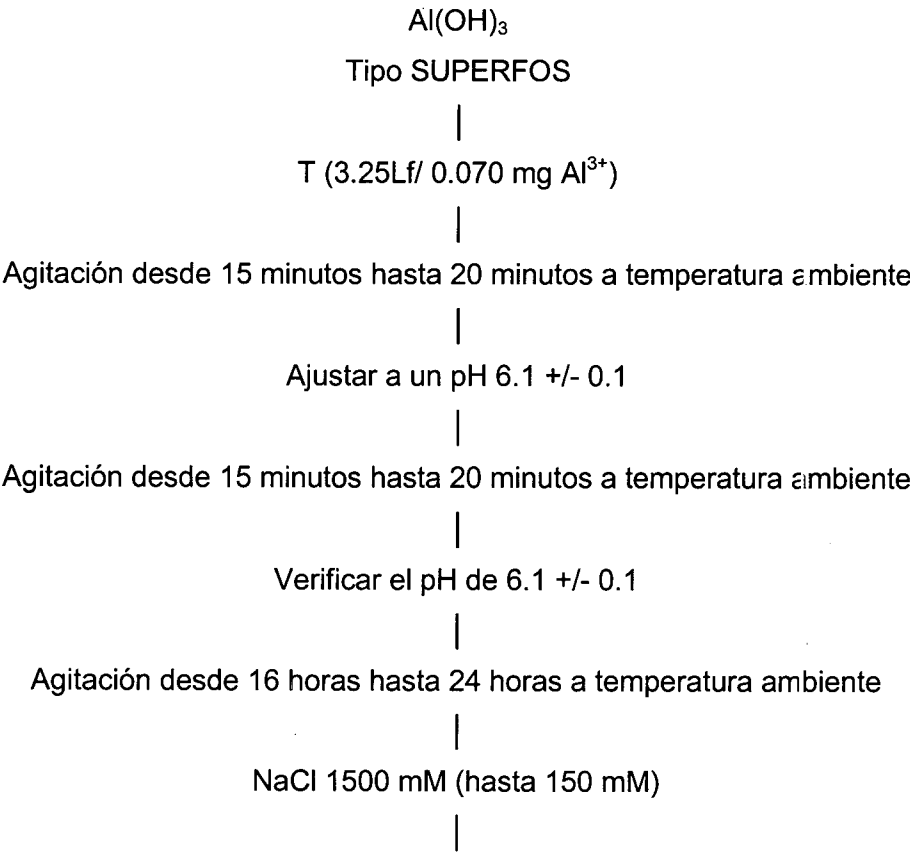
5

10

15

20

25



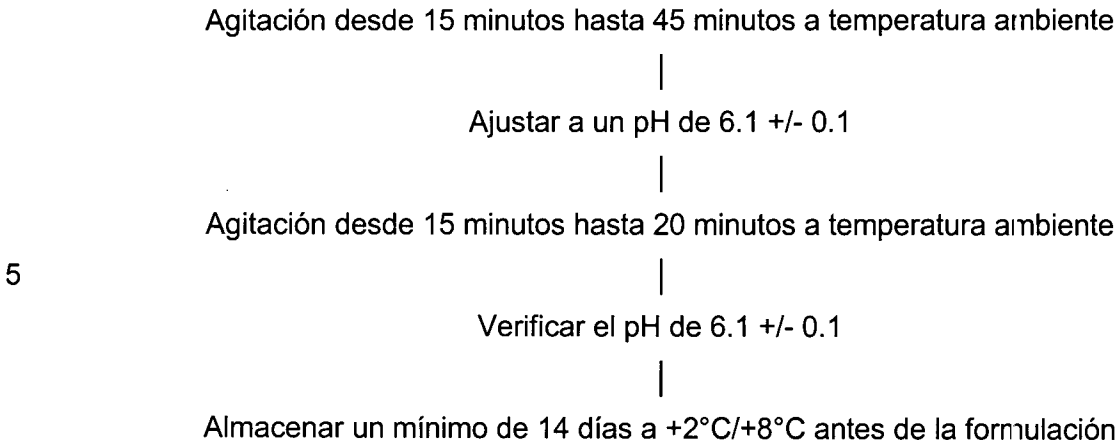
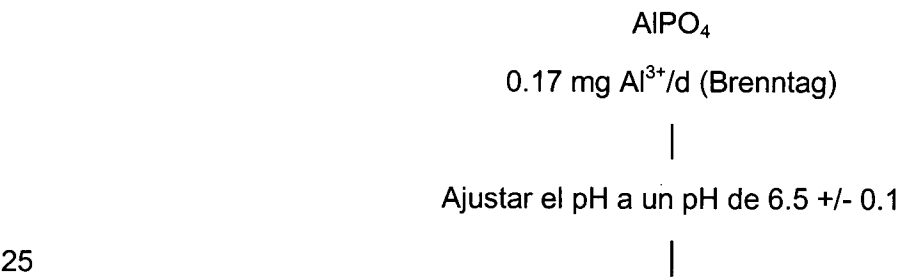


Tabla 2

10 **Método de producción para adsorción de toxoide de tétanos**

COMPOSICIÓN FINAL por dosis	
Tétanos	3.25 Lf (+/- 360 Lf/ml)
Al ³⁺	0.070 mg
NaCl	150 mM
pH	6.1 +/- 0.1
Volumen	aproximadamente 9 µl



mg

Agitación desde 15 minutos hasta 20 minutos a temperatura ambiente°

Verificar el pH de 6.5 +/- 0.1

Pw

20IOU/d

Agitación desde 15 minutos hasta 45 minutos a temperatura ambiente^o

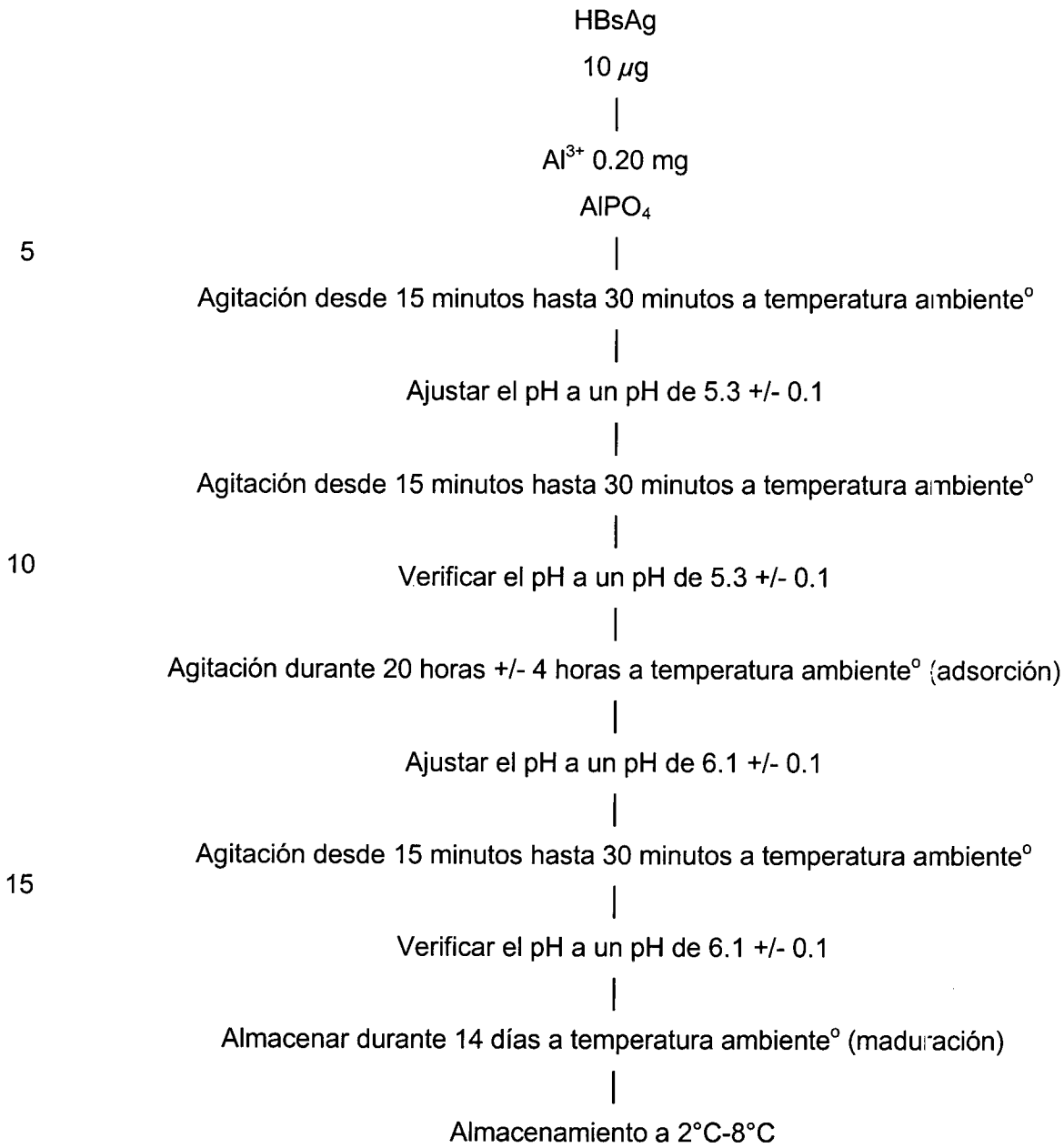
Medir el pH

Almacenamiento a +2°C/+8°C

Tabla 3

Método de producción para adsorción de Pw

COMPOSICIÓN FINAL por dosis			
Antígenos		Adyuvante	[Al ³⁺] (mg)
Pw	20 OU	AlPO ₄	0.170 mg
Al ³⁺	0.170 mg	AlPO ₄	
NaCl	150 mM		
pH	6.8		
Volumen	aproximadamente 65 μ l		



20

25

Tabla 4

Método de producción para adsorción de HBsAg

COMPOSICIÓN FINAL por dosis			
5 10	Antígenos		Adyuvante [Al ³⁺] (mg)
	HBsAg	10 Tg	AlPO ₄ 0.200 mg
	Al ³⁺	0.200 mg	AlPO ₄
	NaCl	150 mM	
	pH	6.1 +/- 0.1	
	Volumen	aproximadamente 50 μ l	

Se probaron varias formulaciones diferentes:

• Una combinación de toxoide de difteria, toxoide de tétanos, células enteras de tosferina, y antígeno superficial de Hepatitis B: DTPw_{SF}-HB como una referencia (DTPw_{SF} significa que es una formulación libre de tiomersal), formulada con el método de producción 1 (Tabla 5).

• Producto Poliorix® de GlaxoSmithKline Biologicals S.A. (poliovirus inactivado independiente, no adsorbido), como referencia no adsorbida en la dosis estándar, formulada con el método de producción 2 (Tabla 5).

• Una combinación de toxoide de difteria, toxoide de tétanos, células enteras de tosferina, antígeno superficial de Hepatitis B, y poliovirus inactivado: DTPw_{SF}-HB-IPV con la adición

del IPV antes del Pw, formulada con el método de producción 3 (Tabla 5).

• Una combinación de toxoide de difteria, toxoide de tétanos, células enteras de tosferina, antígeno superficial de Hepatitis B, y poliovirus inactivado: DTPw_{SF}-HB-IPV con la adición del poliovirus inactivado justo después del T adsorbido. Este método de adición permite la absorción del poliovirus inactivado sobre Al(OH)₃. Esta vacuna se formula con el método de producción 4 (Tabla 5).

Un placebo conteniendo sales de aluminio, poliovirus inactivado, y reguladores de los otros antígenos. Debido a que el poliovirus inactivado es el único en este placebo, no hay competencia por la adsorción. Por consiguiente, el poliovirus inactivado se adsorbe completamente. Esta vacuna se formula con el método de producción 5 (Tabla 5).

Las vacunas formuladas con los métodos de producción 2, 3, 4, y 5 se produjeron con un intervalo de dosis de poliovirus inactivado de entre el 12.5 por ciento y el 100 por ciento de la dosis estándar de poliovirus inactivado de 40/8/32 Unidades Internacionales/0.5 mililitros.

Paso	Método de producción 1: DTPw _{SF} -HB
1	Agua para inyección para alcanzar un volumen de dosis final de 0.5 mililitros.

5

10

15

20

25

Paso	Método de producción 1: DTPw _{SF} -HB
2	Agregar NaCl 1.5M para alcanzar una concentración de 150 mM.
3	Agregar 115 microgramos de Al ³⁺ como el AlPO ₄ .
4	Agregar 10 microgramos de HBsAg adsorbido.
5	Agregar 7.5 Lf de toxoide de difteria adsorbido.
6	Agregar 3.25 Lf de toxoide de tétanos adsorbido.
7	Agitación.
8	Ajustar el pH a 6.5 +/- 0.1.
9	Agitación.
10	Agregar 20 IOU de Pw adsorbido.
11	Agitación.
12	Almacenar de +2°C a +8°C.

Paso	Método de producción 2: IPV independiente			
1	Agregar el IPV en una dosis de:			
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	

5

10

15

Paso	Método de producción 2: IPV independiente			
	40 IU	8 IU	32 IU	
	20 IU	4 IU	16 IU	
	10 IU	2 IU	8 IU	
	5 IU	1 IU	4 IU	
2	Agregar el regulador M199 para alcanzar un volumen final de 0.5 mililitros.			
9	Agitación.			
10	Ajustar el pH a 6.9 +/- 0.2.			
14	Almacenar de +2°C a +8°C.			

20

25

Paso	Método de producción 3: DTPw _{SF} -HB-IPV
1	Agua para inyección para alcanzar un volumen de dosis final de 0.5 mililitros.
2	Agregar NaCl 1.5M para alcanzar una concentración final de 150 mM.
3	Agregar 115 microgramos de Al ³⁺ como AlPO ₄ .

5

10

15

20

25

Paso	Método de producción 3: DTPw _{SF} -HE-IPV			
4	Agregar 10 microgramos de HBsAg adsorbido.			
5	Agregar 7.5 Lf de toxoide de difteria adsorbido.			
6	Agregar 3.25 Lf de toxoide de tétanos adsorbido.			
7	Agitación.			
8	Agregar el IPV en una dosis de:			
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	
	40 IU	8 IU	32 IU	
	20 IU	4 IU	16 IU	
	10 IU	2 IU	8 IU	
	5 IU	1 IU	4 IU	
9	Agitación.			
10	Ajustar el pH a 6.5 +/- 0.1.			
11	Agitación.			
12	Agregar 20 IOU de Pw adsorbido.			
13	Agitación.			
14	Almacenar de +2°C a +8°C.			

	Paso	Método de producción 4: DTPw_{SF}-HE-IPV			
5	1	Agua para inyección para alcanzar un volumen de dosis final de 0.5 mililitros.			
	2	Agregar NaCl 1.5M para alcanzar una concentración final de 150 mM.			
10	3	Agregar 3.25 Lf de toxoide de tétanos adsorbido.			
	4	Agregar el IPV en una dosis de:			
		Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	
		40 IU	8 IU	32 IU	
15		20 IU	4 IU	16 IU	
		10 IU	2 IU	8 IU	
		5 IU	1 IU	4 IU	
20	5	Agitación.			
	6	Agregar 115 microgramos de Al ³⁺ como AlPO ₄ .			
	7	Agregar 10 microgramos de HBsAg adsorbido.			
	8	Agregar 7.5 Lf de toxoide de difteria adsorbido.			
25	9	Agitación.			

5

10

Paso	Método de producción 4: DTPw _{SF} -HE-IPV
10	Ajustar el pH a 6.5 +/- 0.1.
11	Agitación.
12	Agregar 20 IOU de Pw adsorbido.
13	Agitación.
14	Almacenar de +2°C a +8°C.

Tabla 5. Método de producción por dosis de 0.5 mililitros

15

Método de producción 5: Placebo
De acuerdo con el método de producción 3; sin embargo, se han omitido todos los antígenos diferentes del poliovirus inactivado (IPV).

20

Para la formulación del método de producción 1: HBsAg, D, y T se adsorben por separado sobre AlPO₄, AlPO₄, y Al(OH)₃, respectivamente. Los tres antígenos se agregan en secuencia a una suspensión que contiene agua, NaCl, y AlPO₄ libre. La mezcla se agita durante 60 a 75 minutos. Luego se ajusta el pH a 6.5 antes de la adición del Pw adsorbido.

25

Para la formulación del método de producción 3, los tres antígenos adsorbidos se agregan en secuencia a una suspensión que contiene agua, NaCl, y AlPO₄ libre. La mezcla se agita durante 60 a

75 minutos antes de la adición del poliovirus inactivado. El pH se ajusta a 6.5 antes de la adición de los antígenos de Pw.

5 Para la formulación del método de producción 4, el antígeno T se adsorbe sobre $\text{Al}(\text{OH})_3$. Se agrega el antígeno T previamente adsorbido a una suspensión que contiene agua y NaCl, seguido por los poliovirus inactivados tipos 1, 2, y 3. La mezcla se agita durante 60 a 75 minutos antes de la adición del AlPO_4 libre. Entonces se agrega el HBsAg previamente adsorbido, seguido por el antígeno D previamente adsorbido, y la mezcla se agita entonces durante 60 a 10 75 minutos adicionales. El pH se ajusta a 6.5 antes de la adición de los antígenos de Pw.

El método de producción 3 se seleccionó eventualmente debido a la facilidad de fabricación, ya que este protocolo solamente involucró un paso de agitación. Durante el proceso de fabricación de 15 la vacuna, no se utiliza tiomersal, y no se agrega al producto de vacuna final.

La siguiente tabla presenta la composición de las formulaciones para una dosis de 0.5 mililitros.

20

25

Tabla 6. Composición de las formulaciones por dosis de 0.5 mililitros

Descripción	Al ³⁺ como AlPO ₄ para adsorción de D	Al ³⁺ como Al(OH) ₃ para adsorción de D	Al ³⁺ como AlPO ₄ para adsorción de HBsAg	Al ³⁺ como AlPO ₄ para adsorción de Pw	AlPO ₄ libre	Al(OH) ₃ libre	Dosis de toxoide de difteria	Dosis de toxoide de tétanos	Dosis de toserina	Dosis de HBsAg	Dosis de IPV	
											% de dosis estándar	Unidades de antígeno D (*) (T1/T2/T3)
Método de producción 1 DTP _w sf-HB	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	NA	7.5 Lf	3.25 Lf	20IOU	10 µg	NA	NA
Método de producción 2 IPV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	100%	40/8/32
											50%	20/4/16
											25%	10/2/8
											12.50%	5/1/4
Método de producción 3 DTP _w sf-HB-IPV	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	NA	7.5 Lf	3.25 Lf	20IOU	10 µg	100%	40/8/32
											50%	20/4/16
											25%	10/2/8
											12.50%	5/1/4
Método de producción 4 DTP _w sf-HB-IPV	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	NA	7.5 Lf	3.25 Lf	20IOU	10 µg	100%	40/8/32
											50%	20/4/16
											25%	10/2/8
											12.50%	5/1/4
Método de producción 5 Placebo	NA	NA	NA	NA	560 µg	70 µg	NA	NA	NA	NA	100%	40/8/32
											50%	20/4/16
											25%	10/2/8
											12.50%	5/1/4

(*) El contenido de antígeno D es el valor dirigido para la dilución del volumen de polio inactivado concentrado durante la formulación.

Determinación de la potencia de polio sobre ratas mediante seroneutralización.

Se determinó la potencia de la vacuna mediante una prueba de seroneutralización después de la inoculación intramuscular de las ratas (Sprague-Dawley (OFA) o cualquier raza validada de antemano). Los grupos de 10 ratas sanas limpias se inocularon intramuscularmente (0.5 mililitros) con diluciones de las muestras de prueba, del material de referencia en suero regulador de fosfato, o de diluyente (suero regulador de fosfato). Las 10 ratas inoculadas con el diluyente se utilizaron como controles negativos. De 20 a 22 días después de la inoculación (período de inmunización), cada animal se anestesió profundamente antes de la recolección de sangre mediante punción cardíaca. Las muestras de sangre se centrifugaron (a aproximadamente 800 g), y se analizaron los sueros.

Prueba de Seroneutralización:

Los sueros se inactivaron mediante incubación a 56°C durante 30 minutos. Se prepararon tres series de dilución de los sueros, una para cada tipo de polio, en microplacas, utilizando el medio de dilución apropiado. Para los tres tipos de virus de polio, se agregó una cantidad previamente determinada del virus a las diluciones de los sueros. Las tres suspensiones de virus se diluyeron tomando en cuenta sus titulaciones respectivas. La dilución final se denomina como "dilución de trabajo". Cada dilución de trabajo se agregó a las microplacas correspondientes. Luego se sellaron las placas y se incubaron a 37°C $\pm$ 1°C durante 16 horas. Entonces se agregaron las

células Hep-2, y las microplacas se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 7 días. El efecto citopatogénico (CPE) del virus se leyó utilizando un microscopio invertido después de la coloración con azul Coomassie.

5 La presencia de los anticuerpos contra la poliomiелitis inhibe el crecimiento del virus y la aparición de efecto citopatogénico correspondiente. Las titulaciones contra el virus de polio (tipos 1, 2, y 3) corresponden al recíproco de la última dilución sin ningún efecto citopatogénico.

10 En cada grupo, los animales con los anticuerpos neutralizantes se registran, y se determina la titulación de anticuerpos de cada muestra de suero para los diferentes tipos de poliovirus. La titulación de anticuerpo neutralizante se expresa como el $\log_2$ del inverso de la dilución más alta de la muestra de suero que inhibe totalmente el efecto citopático del poliovirus sobre las células Hep-2. Entonces se
15 determina la titulación media geométrica por dilución (GMT) y por tipo de virus para cada grupo de ratas.

Para cada tipo de virus, también se calculó la dilución de la vacuna, y subsiguientemente la cantidad de antígeno D que indujo a los anticuerpos neutralizantes en el 50 por ciento de las ratas (ED_{50})
20 mediante el análisis probit. La ED_{50} se expresó en unidades de antígenos D.

Con el objeto de cuantificar la potencia en relación con aquélla de la vacuna de referencia (usualmente Poliorix®, pero también puede ser una vacuna de DTPaHBIPV, tal como Pediarix®), se midió
25 la potencia relativa (RP) definida como la proporción de dos

respuestas a la dosis equivalentes en una prueba de múltiples dosis. En este planteamiento, se calcula la potencia de la vacuna de prueba mediante el ensayo de líneas paralelas, como se describe en Finney, 1978 (Statistical Method in Biological Assay, Charles Griffin & Company Ltd., Londres, 1978).

Determinación de la potencia de polio tipos 1, 2, y 3 mediante ELISA.

La determinación de la potencia de polio mediante ELISA se lleva a cabo en uno o dos pasos, dependiendo de si la medición se está llevando a cabo sobre el poliovirus inactivado no adsorbido a granel contra las vacunas formuladas, respectivamente:

1. Desorción para la vacuna adsorbida final (para la medición en unidades de antígeno D en las vacunas formuladas - no se requiere para la medición en el antígeno de poliovirus inactivado a granel no adsorbido);

2. Prueba ELISA para la cuantificación del contenido de antígeno D de la vacuna desorbida y no adsorbida y/o polio a granel.

Paso de desorción

Después de la centrifugación durante 10 minutos de la vacuna adsorbida bajo prueba, se llevan a cabo tres desorciones sucesivas, mediante la adición de un regulador de fosfato de desorción al gránulo, la mezcla y la incubación a temperatura ambiente. El primero y el segundo períodos de desorción son de 2 horas, siendo el período de incubación para la tercera extracción de una noche a temperatura ambiente. Las cosechas de las tres extracciones se

reservan y se diluyen con la solución reguladora de fosfato (PBS) sin Ca y Mg, conteniendo albúmina de suero bovino (BSA) y Tween 20.

Los tres antígenos de poliovirus se cuantifican mediante ELISA como se describe en seguida.

5 ***Cuantificación del antígeno D mediante ELISA:***

Las placas de microtitulación se recubren con IgG anti-poliovirus (tipos 1, 2, ó 3) de conejo específica, diluida con regulador de carbonato/bicarbonato (pH de 9.6), y se incuban durante la noche a 4°C. Después de lavarse, se agrega la solución de saturación (suero regulador de fosfato sin Ca y Mg + albúmina de suero bovino al 1 por ciento). Se agregan por duplicado los controles (suero regulador de fosfato) y las diluciones en serie de las muestras de vacuna y del estándar no adsorbido hecho en casa. La preparación estándar trivalente hecha en casa contiene los antígenos calibrados tipos 1, 2, y 3. El calibrador es la Referencia Biológica de la Farmacopea Europea (EPBRP).

Para todos los siguientes pasos, las placas de microtitulación se incuban durante 1 hora con 30 minutos a 37°C, y se lavan. Se agrega IgG de virus anti-polio de conejo (tipos 1, 2, ó 3) conjugada con peroxidasa, diluida con regulador de fosfato (sin Ca y Mg + Tween 20) conteniendo albúmina de suero bovino. Se agrega la solución de sustrato, que contiene la tetrametil-benzidina disuelta en sulfóxido de dimetilo (DMSO), y diluida en regulador de acetato que contiene H₂O₂ al 0.003 por ciento, seguida por una incubación de 15 a 30 minutos en la oscuridad. Entonces se agrega la solución de

bloqueo, que contiene H_2SO_4 . Dentro de una hora, se lee la densidad óptica (O.D.) de cada pozo utilizando un fotómetro establecido a 450 nanómetros con una referencia a 620 nanómetros.

5 La concentración del antígeno D en las muestras de prueba se calcula a partir de la curva estándar obtenida mediante la graficación de los valores de densidad óptica contra las concentraciones de antígeno estándar.

Como un complemento a la Potencia mediante ELISA, se puede detectar cualquier antígeno de poliovirus inactivado no adsorbido mediante el método de verificación de que esté completa:

Verificación de que está completa la adsorción de polio tipos 1, 2, y 3 no enlazados con adyuvante mediante ELISA.

15 Se llevan a cabo dos centrifugaciones sucesivas. Luego se cosecha el sobrenadante, y se prueba no diluido por duplicado en microplacas mediante ELISA. Las placas de microtitulación se recubren con la IgG anti-poliovirus (tipos 1, 2, ó 3) de conejo específica, diluida con regulador de carbonato/bicarbonato (pH de 9.6), y se incuban durante la noche a 4°C. Después de lavarse, se agrega la solución de saturación (suero regulador de fosfato sin Ca y

20 Mg + albúmina de suero bovino al 1 por ciento). Se agregan por duplicado los controles (suero regulador de fosfato), el sobrenadante, y el estándar no adsorbido hecho en casa.

Para todos los siguientes pasos, las placas de microtitulación se incuban durante 1 hora con 30 minutos a 37°C, y se lavan. Se

25 agrega la IgG anti-poliovirus (tipos 1, 2, ó 3) de conejo conjugada

con peroxidasa, diluida con regulador de fosfato (sin Ca y Mg + Tween 20) que contiene albúmina de suero bovino. Se agrega la solución de sustrato, que contiene la tetrametil-benzidina disuelta en sulfóxido de dimetilo (DMSO), y diluida en regulador de acetato que
5 contiene H_2O_2 al 0.003 por ciento, seguida por una incubación de 15 a 30 minutos en la oscuridad. Entonces se agrega la solución de bloqueo, que contiene H_2SO_4 . Dentro de una hora, se lee la densidad óptica (O.D.) de cada pozo utilizando un fotómetro prestablecido a 450 nanómetros con una referencia a 620 nanómetros.

10 La verificación de que está completa se considera positiva (antígeno en el sobrenadante) si la densidad óptica media de la muestra es más alta que los valores de densidad óptica medios de los controles + tres desviaciones estándares, y si la densidad óptica media de la muestra es mayor de 0.1.

15 En el caso de que la verificación de que está completa sea positiva, se mide el contenido de antígeno mediante el método ELISA, como se describe en el segundo paso de la Potencia de Polio Tipos 1, 2, y 3 mediante ELISA.

Método de medición de unidades de opacidad internacionales (IOU).
20

Se puede determinar la concentración celular (IOU) utilizando ya sea una solución estándar de IRPO (Preparación de Opacidad de Referencia Internacional) visual, o bien la medición de absorbencia a 660 nanómetros.

25 Entonces se determina la opacidad de la suspensión de una

sola cepa mediante la aplicación de la ecuación de "opacidad asignada" como sigue:

AO = LO/KOxCO;

5 en donde AO = opacidad asignada, LO = opacidad de cosecha viva, KO = opacidad de cosecha muerta, y CO = opacidad del concentrado.

RESULTADOS

Determinación de la potencia de polio en ratas mediante seroneutralización en la dosis estándar de 40:8:32.

10 Se llevaron a cabo experimentos para determinar la potencia de poliovirus inactivado tipos 1, 2, y 3. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 8 (en el presente documento, 40:8:32 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipos 1, 2, y 3, respectivamente, son equivalentes al 100 por ciento de la dosis de poliovirus inactivado).

Tabla 8

Potencia de poliovirus inactivado tipos 1, 2, y 3 en tres formulaciones de vacuna diferentes

20	Descripción	Potencia de IPV (ED ₅₀ expresada en Unidades Internacionales/dosis)		
		Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
	Ref. Poliorix	20.78	8.88	40.02
25	Ref.DTPaHBIPV	3.21	0.57	8.62

Descripción	Potencia de IPV (ED ₅₀ expresada en Unidades Internacionales/dosis)		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
DTPw _{SF} -HB-IPV			
Método de producción 3	<1.93	0.64	<2.57

5

10

La formulación de DTPw_{SF}-HB-IPV (100 por ciento de IPV) presenta potencias del poliovirus inactivado mejores que la del poliorix de referencia, y similares o mejores que la referencia de DTPaHBIPV.

15

Evaluación de la potencia del poliovirus inactivado con dosificaciones reducidas de poliovirus inactivado.

Se mide la potencia mediante los métodos *in vitro* e *in vivo* descritos anteriormente.

20

Se examinó la potencia mediante ELISA de una dosis reducida de poliovirus inactivado para ambas formulaciones de los métodos de producción 3 y 4 *in vitro*, y se comparó con la referencia de DTPaIPVHB, como se muestra en la Tabla 9. Se probaron dos lotes para cada formulación para el método de producción 3.

25

Se calculó el porcentaje de recuperación con respecto al contenido de antígeno tomado a partir del poliovirus inactivado a granel para cada formulación (por ejemplo, 40/8/32 para la

173B

formulación que contiene el 100 por ciento de poliovirus inactivado;
20/8/16 para la formulación que contiene el 50 por ciento de
poliovirus inactivado; 10/4/8 para la formulación que contiene el 25
por ciento de poliovirus inactivado; 5/2/4 para la formulación que
5 contiene el 12.5 por ciento de poliovirus inactivado).

Tabla 9

	Muestra	T1		T2		T3	
10		Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)
15	DTPaIPVHB Referencia	82%	NP	99%	NP	93%	NP
20	DTPW _{SF} -HB-IPV 1 "Método de producción 3" 100% IPV	46%	47%	94%	<5%	24%	74%
25	DTPW _{SF} -HB-IPV 2 "Método de	80%	<5%	100%	<5.0%	81%	17%

5

10

15

20

25

Muestra	T1		T2		T3	
	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)
producción 3" 100% IPV						
DTPw _{SF} - HB-IPV 1 "Método de producción 3" 50% IPV	48%	31%	98%	<5%	29%	64%
DTPw _{SF} - HB-IPV 2 "Método de producción 3" 50% IPV	71%	<5%	99%	<5%	91%	>5%
DTPw _{SF} - HB-IPV 1 "Método de producción 3" 25% IPV	54%	34%	115%	<5%	33%	71%
DTPw _{SF} -	81%	<5%	115%	<5%	107%	<5%

5

10

15

20

25

Muestra	T1		T2		T3	
	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)
HB-IPV 2 "Método de producción 3" 25% IPV						
DTPw _{SF} ⁻ HB-IPV "Método de producción 3" 12.5% IPV	50%	24%	110%	<5%	28%	60%
DTPw _{SF} ⁻ HB-IPV "Método de producción 4" 100%IPV	41%	48%	93%	<5%	23%	51%
DTPw _{SF} ⁻ HB-IPV "Método de	47%	37%	98%	<5%	28%	69%

5

10

15

20

25

Muestra	T1		T2		T3	
	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)
producción 4" 50% IPV						
DTPw _{SF} ⁻ HB-IPV "Método de producción 4" 25% IPV	51%	28%	80%	<5%	33%	61%
DTPw _{SF} ⁻ HB-IPV "Método de producción 4" 12.5% IPV	42%	22%	100%	<5%	40%	58%
Placebo "Método de producción 5" 100% IPV	86%	<5%	98%	<5%	107%	<5%

Muestra	T1		T2		T3	
	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)	Potencia de polio (% de recuperación)	Verificación de que está completa (% de recuperación)
Placebo "Método de producción 5" 50% IPV	94%	<5%	110%	<5%	111%	<5%
Placebo "Método de producción 5" 25% IPV	80%	<5%	100%	<5%	104%	<5%
Placebo "Método de producción 5" 12.5% IPV	72%	<5%	100%	<5%	98%	<5%

La Tabla 9 muestra que la verificación de que está completa la adsorción es similar para todas las dosis de poliovirus inactivado. El Tipo 1 y el Tipo 3 son fuertemente desorbidos (17 por ciento - 74 por ciento), mientras que el Tipo 2 se queda bien adsorbido. Los tres tipos son bien adsorbidos para la formulación de placebo para todas las dosis de poliovirus inactivado. La adsorción es similar que para

la vacuna de referencia de DTPaIPVHB.

Existe una variabilidad de la verificación de que está completa en el poliovirus inactivado, debido al hecho de que el método de cuantificación de verificación de que está completa no está validado para las formulaciones de DTPwHB IPV ni para las concentraciones más bajas de poliovirus inactivado (<40/8/32 unidades de antígeno D/0.5 mililitros).

Se examinó la potencia relativa (expresada en comparación con la vacuna de Poliorix de referencia) de una dosis reducida de poliovirus inactivado para ambas formulaciones de los métodos de producción 3 y 4 *in vivo*, en comparación con las formulaciones de referencia, como se muestra en las Figuras 1 y 2. Se probaron dos lotes para cada formulación para el método de producción 3.

La Figura 1 muestra que la potencia del poliovirus inactivado de DTPwSF-HB-IPV con el 100 por ciento de poliovirus inactivado es ligeramente mayor que la potencia del poliovirus inactivado en DTPaHBIPV. Se puede ver que la potencia del poliovirus inactivado de DTPwSF-HB-IPV al 50 por ciento a partir de la formulación del método de producción 3 es similar al DTPaHBIPV al 100 por ciento. La potencia del poliovirus inactivado para DTPwSF-HB-IPV al 25 por ciento del método de producción 3 es ligeramente más baja que para el Poliorix®. También se encontró que el 12.5 por ciento de la dosis de poliovirus inactivado no fue suficiente para obtener una buena potencia del poliovirus inactivado.

La Figura 2 muestra que la potencia del poliovirus inactivado

es similar para la formulación del método de producción 3, y para la formulación del método de producción 4. También se muestra que existe una tendencia a tener una mejor potencia para el placebo que para DTPwSF-HB-IPV.

5 Por consiguiente, estos datos confirman que es suficiente una dosis reducida de poliovirus inactivado para obtener una buena potencia *in vivo*.

Ejemplo 2: Factibilidad de no utilizar tiomersal en las vacunas de la invención.

10 La prueba de eficacia conservadora (PET) permite hacer la demostración de la actividad antimicrobiana de la vacuna probada. La prueba consiste en:

- Estímulo de la preparación de vacuna, en su paso de recipiente final, con un inóculo prescrito de microorganismos
- 15 adecuados,
- Almacenamiento de la preparación inoculada a una temperatura prescrita,
- Retiro de muestras del recipiente a intervalos de tiempo especificados, y conteo de los organismos en las muestras tomadas.

20 El procedimiento de prueba de eficacia conservadora se describe en la Farmacopea Europea (5.1.3), y en la USP (<51>). De acuerdo con estos lineamientos, se evalúa la actividad antimicrobiana mediante la comparación de la reducción en el número de microorganismos viables con los criterios mencionados en

25 la siguiente tabla (Tabla 7).

Tabla 7
Criterios de EP y USP

Microorganismos	Tiempo	Criterios: Reducción log			
		EP A	EP B	EP C	USP
<u>Bacterias</u> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6h	2			
	d1	3	1	Ni*	
	d7		3	Ni*	1
	d14			3	3
	d28	Nr*	Ni*	Ni*	Ni*
<u>Levadura y Mohos</u> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus niger</i>	d7	2			Ni*
	d14		1	Ni*	Ni*
	d28	Ni*	Ni*	Ni*	Ni*

Nr*: No se recuperó.
Ni: No aumentó.

Ejemplo 3: Efecto del componente de Hib sobre la potencia del poliovirus inactivado y sobre la estabilidad del poliovirus inactivado a través del tiempo.

Se midió la potencia relativa del poliovirus inactivado como se describe en el Ejemplo 1, para determinar los efectos que pueda tener el componente de Hib sobre la potencia del poliovirus inactivado, y para evaluar la estabilidad del poliovirus inactivado a través del tiempo con diferentes dosis de poliovirus inactivado. Las

vacunas investigadas fueron DTPwHBIPV (40-8-32), DTPwHBIPV con Hib reconstituido y almacenado durante 8 meses, DTPwHBIPV (20-4-16), DTPwHBIPV (20-4-16) con Hib reconstituido y almacenado durante 8 meses, DTPwHBIPV (20-4-16) y almacenado durante 8 meses, DTPwHBIPV (10-2-8) y DTPwHBIPV (10-2-8) con Hib reconstituido y almacenado durante 8 meses. Los valores de potencia relativa se midieron en relación con DTPaIPVHB (Pediarix) (Figura 3a) o con Poliorix (Figura 3b). Se encontró que el componente de Hib no tiene impacto alguno sobre la potencia del poliovirus inactivado. Se encontró que la potencia relativa del poliovirus inactivado se mantiene a los 8 meses (Figura 3).

Ejemplo 4: Efecto de la proporción de $\text{AlPO}_4/\text{Al}(\text{OH})_3$ sobre el aspecto visual, la adsorción de D y T, y la potencia del poliovirus inactivado.

Se llevaron a cabo formulaciones con cambios en la composición de aluminio.

Las formulaciones de DTPw_{SF}-HB-IPV normalmente contienen 630 microgramos de aluminio: 560 microgramos de Al^{3+} como AlPO_4 , 70 microgramos de Al^{3+} como $\text{Al}(\text{OH})_3$. Se utilizan sales de aluminio para adsorber D, T, Pw, y HBsAg. Se agregan 115 microgramos de Al^{3+} del AlPO_4 libre durante la formulación.

Las formulaciones se llevaron a cabo con las siguientes proporciones de Al^{3+} libre.

Tabla 10
Proporción de $\text{AlPO}_4/\text{Al}(\text{OH})_3$

	$\text{Al}(\text{OH})_3$ $\mu\text{g Al}^{3+}$	AlPO_4 $\mu\text{g Al}^{3+}$
Lote 1	0	115
Lote 2	23	92
Lote 3	69	46
Lote 4	46	69
Lote 5	92	23
Lote 6	115	0

Tabla 11

Método de producción para DTPwHB-IPV

Paso	Método de producción 3: DTPw _{SF} -HB-IPV
1	Agua para inyección para alcanzar un volumen de dosis final de 0.5 mililitros.
2	Agregar NaCl 1.5M para alcanzar una concentración final de 150 mM.
3	Agregar 115 microgramos de Al^{3+} en diferentes

5

10

15

20

Paso	Método de producción 3: DTPw _{sf} -HB-IPV
	concentraciones de Al(OH) ₃ /AlPO ₄ .
4	Agregar 10 microgramos de HBsAg adsorbido.
5	Agregar 7.5 Lf de toxoide de difteria adsorbido.
6	Agregar 3.25 Lf de toxoide de tétanos adsorbido.
7	Agitación.
8	Agregar el poliovirus inactivado en una dosis de 40/8/32 Unidades Internacionales.
9	Agitación.
10	Ajustar el pH a 6.5 ± 0.1.
11	Agitación.
12	Agregar 20 IOU de Pw adsorbido.
13	Agitación.
14	Almacenar de +2°C a +8°C.

Se observó el aspecto visual y, hasta la proporción de 69/46, se obtiene una acumulación aceptable.

25

Las formulaciones se llevaron a cabo con el mismo método de

producción y un intervalo de dosis para el poliovirus inactivado entre el 0 por ciento y el 100 por ciento de la dosis regular de poliovirus inactivado.

5 El porcentaje de adsorción de los toxoides de D y T se midió mediante ELISA. La estabilidad de la adsorción fue seguida por un tratamiento de 7 días a 37°C. Los resultados se presentan en las Tablas 12 y 14.

10 **Tabla 12**
Porcentaje de desorción de toxoide de D en DTPwHB-IPV con el intervalo de dosis del poliovirus inactivado

15

		PROPORCIÓN DE $Al(OH)_3/AlPO_4$						
	Dosis de IPV	0/115		23/92		46/69		
		T0	7d37°C	T0	7d37°C	T0	7d37°C	
20	Pw_{SF}	0%	<1%	25%	<1%	6%	/	
		25%	<1%	29%	<1%	15%	<1%	5%
		50%	3%	41%	<1%	26%	<1%	17%
		100%	4%	49%	<1%	23%	<1%	11%

Tabla 13

Porcentaje de desorción del toxoide de T en DTPwHB-IPV con
intervalo de dosis de poliovirus inactivado

		PROPORCIÓN DE $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{AlPO}_4$					
	Dosis de IPV	0/115		23/92		46/69	
		T0	7d37°C	T0	7d37°C	T0	7d37°C
Pw_{SF}	0%	<1%	34%	<1	12%	/	
	25%	<1%	50%	<1	32%	<1%	12%
	50%	5%	61%	<1	51%	<1%	33%
	100%	8%	63%	<1	41%	<1%	29%

Siguió la adsorción del poliovirus inactivado. La estabilidad de
la adsorción fue seguida por un tratamiento de 21 días a 25°C.

Tabla 14
Porcentaje de desorción del poliovirus inactivado en DTPwHB-
IPV con un intervalo de dosis de poliovirus inactivado

5	IPV		Estimación de Ag no adsorbido					
PROPORCIÓN DE $Al(OH)_3/AlPO_4$								
0/115			23/92		46/69			
10	Dosis	Tipo	T0	21d25°C	T0	21d25°C	T0	21d25°C
	0%	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	ACUMULACIÓN	
15	25%	Tipo 1	~10-20%	~20-30%	~10-20%	~20-30%	<10%	~20-30%
		Tipo 2	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%
		Tipo 3	>30%	>30%	~20-30%	>30%	<10%	>30%
20	50%	Tipo 1	>30%	>30%	~10-20%	>30%	~10-20%	>30%
		Tipo 2	~10-20%	~10-20%	<10%	<10%	<10%	<10%
		Tipo 3	>30%	>30%	~10-20%	>30%	~10-20%	>30%
25	100%	Tipo 1	>30%	>30%	~10-20%	>30%	~10-20%	>30%
		Tipo 2	~10-20%	~10-20%	<10%	<10%	<10%	<10%
		Tipo 3	>30%	>30%	~20-20%	>30%	30%	>30%

El aumento del contenido de $\text{Al}(\text{OH})_3$ en las formulaciones permite tener una mejora de adsorción para D, T, e IPV.

La mejor proporción de adsorción obtenida fue con la proporción de $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{AlPO}_4$ de 46/69.

5

En esta proporción:

- La adsorción de T y D está completa en el T0. La desorción después de un estudio de estabilidad acelerada de 7 días a 37°C presenta un <20 por ciento de desorción para D, un <30 por ciento para T.

10

- Cada tipo de poliovirus inactivado es adsorbido. La desorción del Tipo 3 ocurre a los 21 días a 25°C .

Se probaron las formulaciones con la proporción de 46/69 *in vivo*, y se compararon con Tetravac, Poliorix, y una vacuna de DTPaIPV.

15

Tabla 15

Resultados de potencias *in vivo*

Muestra	ED ₅₀		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
DTPw-HB-IPV 100%/HIB Proporción 46/69	<1.93	<0.64	2.57
DTPw-HB-IPV 50%/HIB	<1.59	0.46	<1.67

20

25

5

10

Muestra	ED ₅₀		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Proporción 46/69			
DTPw-HB-IPV 25%/HIB Proporción 46/69	3.08	0.96	3.25
Tetravac	8.53	0.39	9.15
Poliorix	9.52	2.64	15.06
DTPaHBIPV	<5.18	<0.64	15.01

15

No hay diferencias significativas (EC₅₀) entre las formulaciones de DTPw-HB-IPV. Los DTPaHBIPV, Tetravac, y Poliorix dan resultados similares, inferiores a las formulaciones de DTPwHBIPV (excepto por el Tipo 2 para el cual las formulaciones son equivalentes).

20

Ejemplo 5: Evaluación clínica de la vacuna de investigación de DTPwHB-IPV/Hib con dosificaciones reducidas de poliovirus inactivado.

25

Se planea un estudio de factibilidad en Fase II, para evaluar la inmunogenicidad, la reactogenicidad, y la seguridad de tres formulaciones diferentes de la vacuna de DTPw-HBV-IPV/Hib de

investigación de GSK Biologicals, comparándose con las vacunas comerciales de DTPw-HBV/Hib e IPV administradas de una manera concomitante.

• **Indicación/Poblaciones:**

- 5 Inmunización primaria para bebés sanos en la primera semana de vida contra las enfermedades de difteria, tétanos, tosferina, Hepatitis B, poliomielitis, y *Haemophilus influenzae* tipo b.

Grupos de estudio:

Vacuna de DTPw-HBV-IPV (dosis estándar)/Hib.

- 10 Vacuna de DTPw-HBV-IPV (49 por ciento de dosis estándar)/Hib.

Vacuna de DTPw-HBV-IPV (26 por ciento de dosis estándar)/Hib.

Vacunas de DTPw-HBV/Hib + IPV.

- 15 • **Objetivos Co-primarios:**

Los objetivos co-primarios se evaluarán de una manera en secuencia: es decir, los segundo y tercer objetivos se evaluarán solamente si se ha satisfecho el anterior.

- ✓ Demostrar la no inferioridad de la vacuna de DTPw-HBV-
20 IPV (dosis estándar)/Hib para la vacuna de poliovirus inactivado co-administrada con la vacuna de DTPw-HBV/Hib en términos de respuesta al anticuerpo para los tres tipos de poliovirus, un mes después del curso de vacunación primaria.

25 *El objetivo de la no inferioridad se alcanzará si el límite superior del CI al 95 por ciento asintótico estandarizado sobre la*

diferencia entre grupos (DTPw-HBV/Hib + IPV menos DTPw-HBV-IPV (dosis estándar)/Hib) en términos de índices de seroprotección para cada uno de los tres tipos de poliovirus es de ≤ 10 por ciento.

- 5 √ Demostrar la no inferioridad de la vacuna de DTPw-HBV-IPV (49 por ciento de la dosis estándar)/Hib para la vacuna de poliovirus inactivado co-administrada con la vacuna de DTPw-HBV/Hib en términos de respuesta al anticuerpo para los tres tipos de poliovirus, un mes después del curso de vacunación primaria.

10 *El objetivo de la no inferioridad se alcanzará si el límite superior del CI al 95 por ciento asintótico estandarizado sobre la diferencia entre grupos (DTPw-HBV/Hib + IPV menos DTPw-HBV-IPV (49 por ciento de la dosis estándar)/Hib) en términos de índices de seroprotección para cada uno de los tres tipos de poliovirus es de ≤ 10 por ciento.*

- 15 √ Demostrar la no inferioridad de la vacuna de DTPw-HBV-IPV (26 por ciento de la dosis estándar)/Hib para la vacuna de poliovirus inactivado co-administrada con la vacuna de DTPw-HBV/Hib en términos de respuesta al anticuerpo para los tres tipos de poliovirus, un mes después del curso de vacunación primaria.

20 *El objetivo de la no inferioridad se alcanzará si el límite superior del CI al 95 por ciento asintótico estandarizado sobre la diferencia entre grupos (DTPw-HBV/Hib + IPV menos DTPw-HBV-IPV (26 por ciento de la dosis estándar)/Hib) en términos de índices de seroprotección para cada uno de los tres tipos de poliovirus es de ≤ 10 por ciento.*

25

- **Objetivos Secundarios:**

Inmunogenicidad

Evaluar la inmunogenicidad de la vacuna candidata de DTPw-HBV-IPV/Hib en términos de la respuesta a todos los antígenos de vacuna, en comparación con las vacunas de DTPw-HBV/Hib y de IPV co-administradas.

Reactogenicidad

Evaluar la reactogenicidad y seguridad de las vacunas en estudio, en términos de síntomas solicitados, síntomas no solicitados, y eventos adversos graves.

- **Programa de Vacunación**

Programa de vacunación primaria de tres dosis a las 6, 10, y 14 semanas de edad. Todos los sujetos reciben una dosis de Hepatitis B al nacer.

- **País:**

Filipinas.

- **Muestreo de Sangre:**

Antes y después de la vacunación 3.

- **Formulaciones de Vacuna:**

Tabla 16

Formulaciones de vacunas

Vacuna	Formulación/Dosis	Presentación	Volumen
--------	-------------------	--------------	---------

Vacuna	Formulación/Dosis	Presentación	Volumen
DTPw-HBV- IPV/Hib de GSK Biologicals	Toxoide de difteria: no menos de 30 IU (7.5 Lf). Toxoide de tétanos: no menos de 60 IU (3.25 Lf). <i>Bordetella pertussis</i> , muerta: no menos de 4 IU (20 OU). r-ADN HBsAg: 10 µg. Aluminio como sales: 0.66 mg.	Líquido blancuzco en frascos de una sola dosis.	0.5 mililitros de la vacuna reconstituida.
Componente de IPV (dosis estándar)	Poliovirus inactivado tipo 1: 40 unidades de antígeno D. Poliovirus inactivado tipo 2: 8 unidades de antígeno D. Poliovirus inactivado tipo 3: 32 unidades de antígeno D.		

5

10

15

20

Vacuna	Formulación/Dosis	Presentación	Volumen
Componente de IPV (49 por ciento de dosis estándar)	49 por ciento de dosis estándar completa de IPV (40-8-32).		
Componente de IPV (26 por ciento de dosis estándar)	26 por ciento de dosis estándar completa de IPV (40-8-32).		
	Conjugado de polisacárido capsular de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b: 2.5 µg. y toxoide de tétanos: 5-10 µg. Lactosa: 12.6 mg. Aluminio como sales: 30 µg.	Gránulo seco por congelación en frascos de una sola dosis.	

25

5

10

15

20

25

Vacuna	Formulación/Dosis	Presentación	Volumen
DTPw-HBV- IPV/Hib (Zilbrix^{MR} Hib) de GSK Biologicals	Toxoide de difteria: no menos de 30 IU (7.5 Lf). Toxoide de tétanos: no menos de 60 IU (3.25 Lf). <i>Bordetella pertussis</i> , muerta: no menos de 4 IU (20 OU). r-ADN HBsAg: 10 µg. Aluminio como sales: 0.66 mg. Tiomersal: 8 µg.	Líquido blancuzco en frascos de dos dosis.	1 mililitro de la vacuna reconstituida.
	Conjugado de polisacárido capsular de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b: 2.5 µg. y toxoide de tétanos: 5-10 µg. Lactosa: 12.6 mg. Aluminio como sales: 30 µg.	Gránulo seco por congelación en frascos de dos dosis.	
IPV de GSK Biologicals (Poliorix ^{MR})	Poliovirus inactivado tipo 1: 40 unidades de antígeno D.	Líquido blancuzco en frascos de una sola dosis.	0. 5 mililitros.

160

Vacuna	Formulación/Dosis	Presentación	Volumen
	Poliovirus inactivado tipo 2: 8 unidades de antígeno D. Poliovirus inactivado tipo 3: 32 unidades de antígeno D. 2-fenoxi-etanol, máximo 2.5 mg. Polisorbato, máximo 5 µg. Formaldehído, máximo 100 µg. Suero regulado con fosfato. Contiene aminoácidos para inyección, cantidad suficiente hasta 0.5 mililitros.		

PRE-ADSORCIÓN DE LOS ANTÍGENOS

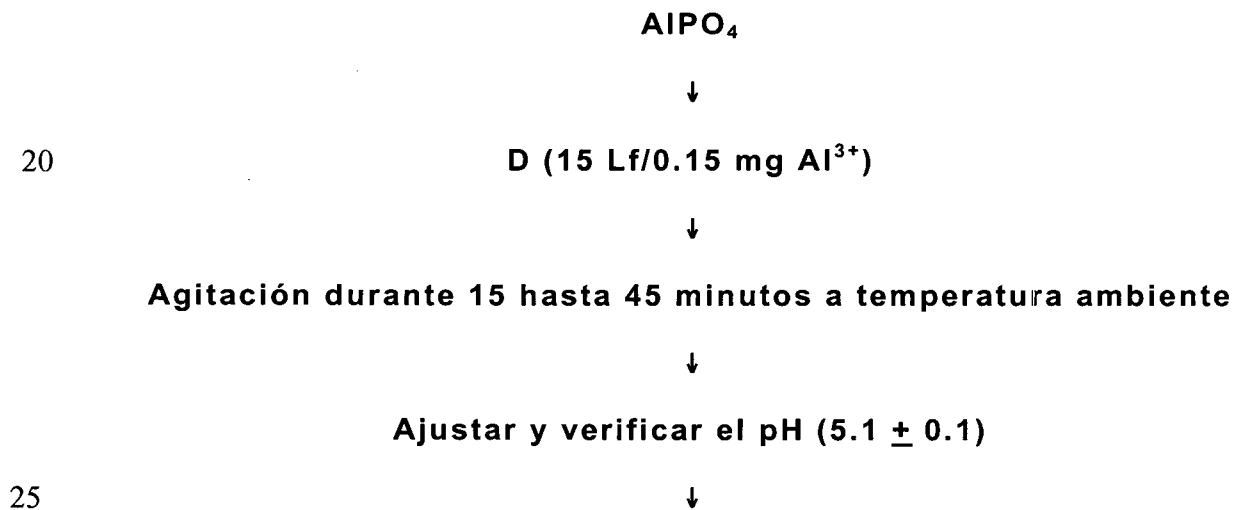
La formulación de DTPw-HBV-IPV combina el toxoide de difteria, el toxoide de tétanos, tres cepas de *Bordetella pertussis*, el antígeno superficial mayor purificado (HBsAg) del virus de Hepatitis B (HBV), y el poliovirus inactivado (IPV). Estos antígenos, excepto el

poliovirus inactivado, se pre-adsorbieron primero sobre sal de aluminio antes de mezclarse con la sal de aluminio, el regulador de cloruro de sodio, y agua para inyección.

Adsorción del toxoide de difteria

5 El concentrado purificado de difteria se adsorbió sobre fosfato de aluminio en una proporción de 15 Lf de toxoide difteria/0.15 miligramos de Al^{3+} . Los dos componentes se agitaron durante 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente. El pH se ajustó a un pH de 5.1 ± 0.1 , seguido por agitación durante 15 hasta 45 minutos. La
10 mezcla se almacenó durante una semana a 37°C . Después de agitar durante 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente, el pH se ajustó a un pH de 6.1 ± 0.1 . El concentrado adsorbido se almacenó a $+2^\circ\text{C} - +8^\circ\text{C}$ durante cuando menos 7 días antes de la formulación final de la vacuna de DTPw-HB-IPV. La Figura 1 que se encuentra
15 posteriormente resalta el proceso de manufactura de adsorción del volumen de difteria previamente adsorbido.

Diagrama de flujo de adsorción de toxoide de difteria



Agitación durante 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente



Adsorción durante 7 días a 37°C



5 **Agitación durante 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente**



Ajustar y verificar el pH (6.1 ± 0.1)



10 **Almacenar un mínimo de 7 días a +2°C - +8°C antes de la
formulación**

Adsorción de toxoide de tétanos

El concentrado de tétanos purificado se adsorbió sobre hidróxido de aluminio en una proporción de 3.25 Lf/0.07 mg de Al^{3+} . Los dos componentes se agitaron durante 15 hasta 20 minutos. El pH se ajustó a un pH de 6.1 ± 0.1 . La mezcla se almacenó bajo agitación durante 16 hasta 24 horas a temperatura ambiente. Se agregó una solución en cloruro de sodio de una concentración nominal de 1,500 mM (hasta 150 mM). Después de agitar durante 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente, el pH se ajustó a 6.1 ± 0.1 . El concentrado adsorbido se almacenó a +2°C - +8°C durante cuando menos 14 días antes de la formulación final de la vacuna de DTPw-HBV-IPV.

Diagrama de flujo de adsorción de toxoide de tétanos

$Al(OH)_3$



25

T (3.25 Lf/0.07 mg Al³⁺)

↓

Agitación durante 15 hasta 20 minutos a temperatura ambiente

↓

5

Ajustar y verificar el pH a 6.1 ± 0.1

↓

Agitación durante 16 horas hasta 24 horas a temperatura ambiente

↓

10

NaCl 1500 mM (hasta 150 mM)

↓

Agitación durante 15 hasta 45 minutos a temperatura ambiente

↓

Ajustar y verificar el pH (6.1 ± 0.1)

15

↓

Almacenar un mínimo de 14 días a +2°C - +8°C antes de la formulación

Adsorción del antígeno de Hepatitis B.

20

El volumen de HBsAg purificado estéril se mezcló con una suspensión estéril de fosfato de aluminio con el objeto de obtener una suspensión que contiene, por 10 microgramos de HBsAg, 0.2 miligramos de Al³⁺ (como fosfato de aluminio), NaCl 150 mM, en un volumen final de aproximadamente 50 microlitros.

25

Procedimiento de adsorción de HBsAg

HBsAg (10 μ g/0.5 ml)

↓

Al³⁺ (0.2 mg/0.5 ml) (AlPO₄)

↓

5 **Agitación durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente**

↓

Ajustar y verificar el pH (5.3 $\pm$ 0.1)

↓

Agitación durante 16 a 24 horas a temperatura ambiente

10 ↓

Ajustar el pH a 6.1 $\pm$ 0.1

↓

Almacenar durante 14 días a temperatura ambiente

↓

15 **Almacenamiento a 4°C**

Adsorción del antígeno de Pw.

La solución de AlPO₄ se transfirió asépticamente a un recipiente estéril. La solución se agitó durante 5 a 10 minutos, y el pH se ajustó a 6.5 $\pm$ 0.1 con HCl 1M o con HCl 0.5M directamente en el recipiente. La solución se agitó durante 15 a 20 minutos. El pH se verificó (6.5 $\pm$ 0.1) y se ajustó si era necesario.

Antes de la adsorción, se mezcló la cosecha reservada de tosferina (PPH) durante un mínimo de 15 minutos antes de usarse, y luego se agregó la PPH al recipiente estéril que contenía el AlPO₄.

La suspensión se agitó durante un mínimo de 15 minutos a temperatura ambiente, y se pudo almacenar durante la noche a temperatura ambiente. Si el producto se almacenaba durante la noche a temperatura ambiente, se tenía que volver a suspender durante un mínimo de 30 minutos antes de la distribución. Se tomaron muestras para la prueba.

El volumen adsorbido de Pw se distribuyó en frascos de vidrio estériles, y se almacenaron a 2-8°C.

Diagrama de flujo de adsorción de Pw

Transferir AlPO_4 a un recipiente de acero inoxidable estéril



Ajustar el pH a 6.5 ± 0.1



Agitación durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente



Verificar el pH y ajustar si es necesario (6.5 ± 0.1)



Agregar el PPH al recipiente de acero inoxidable estéril



Agitación durante mínimo 15 minutos a temperatura ambiente



Distribución en frascos de vidrio



Almacenamiento del Pw adsorbido a 2-8°C**FORMULACIÓN FINAL DE DTPW-HBV-IPV**

El proceso se hizo como sigue:

- 5 - Se mezcló la solución de cloruro de sodio y agua para inyección con el objeto de alcanzar una concentración final de NaCl 150 mM.
- Se agregó AlPO_4 con el objeto de obtener una concentración de Al^{3+} libre de 0.15 miligramos/dosis.
- 10 - Se agregaron los concentrados adsorbidos de HEF, difteria, y tétanos, con el objeto de obtener una concentración final de 10 microgramos de HBsAg, 7.5 Lf de toxoide de difteria, y 3.25 Lf de toxoide de tétanos por dosis de 0.5 mililitros.
- Se agregó el poliovirus inactivado con el objeto de
- 15 obtener una concentración final de 40/8/32 o de 19.6/3.9/15.7 o de 10.4/2.1/8.3 UI/d.
- Agitación suave durante 60 hasta 120 minutos a temperatura ambiente.
- Se ajustó el pH a 6.5 ± 0.1 .
- 20 - Agitación durante 15 hasta 20 minutos a temperatura ambiente.
- Se verificó el pH: 6.5 ± 0.1 .
- Se agregó el concentrado de Pw adsorbido con el objeto de obtener una concentración final de 20 IOU por dosis de 0.5
- 25 mililitros.

- Agitación durante 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.

- Se midió el pH.

- El volumen final se almacenó entre +2°C y +8°C, hasta
5 llenarse.

Diagrama de flujo de formulación de la vacuna de DTPw-HBV

Agua para inyección hasta 0.5 ml



10 NaCl 1.5M a 150 mM



AlPO₄ (115 µg Al³⁺)



15 HBsAg adsorbido: 10 µg



Difteria adsorbida: 7.5 Lf



Tétanos adsorbido: 3.25 Lf



20 IPV 40/8/32 ó 19.6/3.9/15.7 ó 10.4/2.1/8.3 IU/d



Agitación durante 60 minutos hasta 120 minutos a temperatura ambiente



25 Ajustar y verificar el pH (6.5 ± 0.1)

↓

Pw adsorbido: 20 IOU

↓

Agitación durante 15 minutos hasta 45 minutos a temperatura ambiente

5

Ejemplo 6: Evaluación clínica de la vacuna de DTPa-HBV-IPV/Hib de investigación, con dosificaciones reducidas de HIV e IPV.

10 Se planea un estudio de exploración en Fase II, para evaluar la inmunogenicidad, la reactogenicidad, y la seguridad de cuatro formulaciones diferentes de la vacuna de DTPa-HBV-IPV/Hib de investigación de GSK Biologicals contra la vacuna comercial de DTPa-HBV-IPV/Hib, y se administraron de una manera concomitante
15 las vacunas comerciales de DTPw-HBV-IPV/Hib y de IPV.

• **Indicación/Poblaciones:**

Inmunización primaria de bebés sanos en la primera semana de vida contra las enfermedades de difteria, tétanos, tosferina, Hepatitis B, poliomielitis, y *Haemophillus influenzae* tipo b.

20 • **Grupos de Estudio:**

Vacuna de DTPa-HBV-IPV (49 por ciento de dosis estándar)/Hib: 5 microgramos.

Vacuna de DTPa-HBV-IPV (49 por ciento de dosis estándar)/Hib: 2.5 microgramos.

25 Vacuna de DTPa-HBV-IPV (26 por ciento de dosis

estándar)/Hib: 5 microgramos.

Vacuna de DTPa-HBV-IPV (26 por ciento de dosis estándar)/Hib: 2.5 microgramos.

Vacuna de DTPa-HBV-IPV/Hib.

5 Vacunas de DTPw-HBV/Hib + IPV.

- **Objetivos Primarios:**

Evaluar la inmunogenicidad de las vacunas candidatas de DTPa-HBV-IPV/Hib en términos de la respuesta al PRP y a los tres antígenos de polio (polio 1, 2, y 3).

10

- **Objetivos Secundarios:**

Inmunogenicidad

Evaluar la inmunogenicidad de todas las vacunas en estudio en términos de la respuesta a todos los antígenos de vacuna.

15

Reactogenicidad

Evaluar la reactogenicidad y la seguridad de las vacunas en estudio, en términos de síntomas solicitados, síntomas no solicitados, y eventos adversos graves.

- **Programa de Vacunación**

20

Programa de vacunación primaria de tres dosis a las 6 semanas de edad. Todos los sujetos reciben una dosis de Hepatitis B al nacer.

- **País:**

TBC.

25

- **Muestreo de Sangre:**

Antes y después de la vacunación 3.

• **Formulaciones de Vacuna:**

La vacuna está constituida de dos partes: una parte líquida (DTPa-HB-IPV) y una parte secada por congelación (Hib).

5 Los D, T, PT, FHA, PRN, y HBsAg se pre-adsorben preliminarmente. Se mezclan agua y NaCl con los diferentes antígenos. La mezcla se agita para homogeneizarse, y se ajusta el pH. La composición final de la parte de DTPa-HB-IPV de la vacuna se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla 17

**Composición para una dosis humana de 0.5 mililitros de DTPa-
HBV-IPV**

15

Componente	Cantidad
Toxoide de D	25 Lf
Toxoide de T	10 Lf
PT	25 µg
FHA	25 µg
PRN	8 µg
HBsAg	10 µg
IPV tipo 1	40 ó 19.6 ó 10.4 IU

20

25

134

IPV tipo 2	8 ó 3.9 ó 2.1 IU
IPV tipo 3	32 ó 15.7 u 8.3 IU
Al ³⁺	De 700 a 790 μ g

5

El Hib se adsorbe previamente. El Hib previamente adsorbido se mezcla con sacarosa o lactosa antes del secado por congelación. La cantidad de Hib será de 2.5 ó de 5 ó de 10 microgramos por dosis humana. El contenido de aluminio será de 30 a 120 microgramos de Al³⁺ como AlPO₄ por dosis humana.

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para la elaboración de una vacuna (es decir, una vacuna de combinación) que comprende el poliovirus inactivado tipo 1, el cual comprende los pasos de: mezclar toxoide de difteria y toxoide de tétanos, seguidos por la adición del poliovirus inactivado tipo 1 en una dosis mayor de 10 unidades de antígeno D y menos de 20 unidades de antígeno D, y opcionalmente los poliovirus inactivados tipos 2 y/o 3 (IPV).

2. Un método para la elaboración de una vacuna (es decir, una vacuna de combinación) que comprende el poliovirus inactivado tipo 1, el cual comprende los pasos de: mezclar de toxoide de difteria y toxoide de tétanos, seguidos por la adición del poliovirus inactivado tipo 1 en una cantidad mayor de 10 unidades de antígeno D y menos de 20 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros, y opcionalmente el poliovirus inactivado tipos 2 y/o 3 (IPV).

3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde la vacuna comprende el poliovirus inactivado tipo 1 en del 26 al 49 por ciento, del 30 al 45 por ciento, del 33 al 40 por ciento, o del 35 al 37 por ciento de una dosis estándar de 40 unidades de antígeno D.

4. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde la vacuna comprende el poliovirus inactivado tipo 1 en del 26 al 49 por ciento, del 30 al 45 por ciento, del 33 al 40 por ciento, o del 35 al 37 por ciento de una dosis estándar de 40 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros.

5. El método de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la vacuna comprende adicionalmente el poliovirus inactivado tipo 3 en una dosis de 8 a 20 unidades de antígeno D, de 9 a 19 unidades de antígeno D, de 10 a 18 unidades de antígeno D, de 11 a 17 unidades de antígeno D, de 12 a 16 unidades de antígeno D, o de 13 a 15 unidades de antígeno D; por ejemplo de alrededor o exactamente 14 unidades de antígeno D.

6. El método de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la vacuna comprende adicionalmente el poliovirus inactivado tipo 3 en una cantidad de 8 a 20 unidades de antígeno D, de 9 a 19 unidades de antígeno D, de 10 a 18 unidades de antígeno D, de 11 a 17 unidades de antígeno D, de 12 a 16 unidades de antígeno D, o de 13 a 15 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros; por ejemplo alrededor o exactamente 14 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros.

7. El método de la reivindicación 5 ó 6, en donde la vacuna comprende el poliovirus inactivado tipo 3 en una dosis mayor de 8 y menor de 20 unidades de antígeno D.

8. El método de la reivindicación 5 ó 6, en donde la vacuna comprende el poliovirus inactivado tipo 3 en una cantidad mayor de 8 y menor de 20 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros.

9. Un método para la elaboración de una vacuna (es decir, una vacuna de combinación) que comprende el poliovirus inactivado tipo 3, el cual comprende los pasos de: mezclar toxoide de difteria y toxoide de tétanos, seguidos por la adición del poliovirus inactivado tipo 3 en una dosis mayor de 8 y menor de 20 unidades de antígeno

D, de 9 a 19 unidades de antígeno D, de 10 a 18 unidades de antígeno D, de 11 a 17 unidades de antígeno D, de 12 a 16 unidades de antígeno D, o de 13 a 15 unidades de antígeno D; por ejemplo, alrededor o exactamente 14 unidades de antígeno D, y
5 opcionalmente el poliovirus inactivado tipos 1 y/o 3 (IPV).

10. Un método para la elaboración de una vacuna (es decir, una vacuna de combinación) que comprende el poliovirus inactivado tipo 3, el cual comprende los pasos de: mezclar toxoide de difteria y toxoide de tétanos, seguidos por la adición del poliovirus inactivado
10 tipo 3 en una cantidad mayor de 8 y menor de 20 unidades de antígeno D, de 9 a 19 unidades de antígeno D, de 10 a 18 unidades de antígeno D, de 11 a 17 unidades de antígeno D, de 12 a 16 unidades de antígeno D, o de 13 a 15 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros; por ejemplo alrededor o exactamente 14 unidades de
15 antígeno D por 0.5 mililitros, y opcionalmente el poliovirus inactivado tipos 1 y/o 3 (IPV).

11. El método de la reivindicación 9 ó 10, en donde la vacuna comprende adicionalmente el poliovirus inactivado tipo 1 en una dosis de 10 a 20 unidades de antígeno D, de 11 a 19 unidades de antígeno D, de 12 a 18 unidades de antígeno D, de 13 a 17 unidades de antígeno D, de 14 a 16 unidades de antígeno D; por ejemplo, alrededor o exactamente 15 unidades de antígeno D.

12. El método de la reivindicación 9 ó 10, en donde la vacuna comprende adicionalmente el poliovirus inactivado tipo 1 en una
25 cantidad de 10 a 20 unidades de antígeno D, de 11 a 19 unidades de

antígeno D, de 12 a 18 unidades de antígeno D, de 13 a 17 unidades de antígeno D, de 14 a 16 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros; por ejemplo, alrededor o exactamente 15 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros.

5 13. El método de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la vacuna comprende adicionalmente el poliovirus inactivado tipo 2 en una dosis de 2 a 4 unidades de antígeno D.

10 14. El método de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la vacuna comprende adicionalmente el poliovirus inactivado tipo 2 en una dosis de 2 a 4 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros.

15 15. El método de la reivindicación 13 ó 14, en donde la vacuna comprende el poliovirus inactivado tipo 2 en una dosis de 2 a 20 unidades de antígeno D y menor de 4 unidades de antígeno D, o en una dosis de alrededor o exactamente 3 unidades de antígeno D.

15 16. El método de la reivindicación 13 ó 14, en donde la vacuna comprende el poliovirus inactivado tipo 2 en una cantidad mayor de 2 unidades de antígeno D y menor de 4 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros, o en una cantidad de alrededor o exactamente 3 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros.

20 17. El método de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el valor de potencia relativa de la vacuna es de cuando menos 0.85, 0.9, 0.95, ó 1, comparándose con una vacuna que comprende 40 unidades de antígeno D del poliovirus inactivado tipo 1.

25 18. El método de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el valor de potencia relativa de la vacuna es de cuando menos 0.85,

0.9, 0.95, ó 1, comparándose con la vacuna que comprende 8 unidades de antígeno D del poliovirus inactivado tipo 2.

19. El método de las reivindicaciones 1 a 18, en donde el valor de potencia relativa de la vacuna es de cuando menos 0.85, 0.9, 0.95, ó 1, comparándose con una vacuna que comprende 32 unidades de antígeno D del poliovirus inactivado tipo 3.

20. El método de las reivindicaciones 1 a 19, el cual comprende el paso subsiguiente de ajustar el pH a 6.5 ± 0.5 , o a un pH de 5.9 a 7.2, o a un pH de 6 a 7, o a un pH de 6.2 a 6.8, o a un pH de 6.4 a 6.6.

21. El método de las reivindicaciones 1 a 20, el cual comprende los pasos subsiguientes de agregar un componente de tosferina de células enteras muertas o acelular, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en donde está presente el fosfato de aluminio libre antes de la adición de los antígenos.

22. El método de las reivindicaciones 1 a 21, el cual comprende el paso adicional de agregar el antígeno superficial de Hepatitis B antes del ajuste del pH o antes de la adición del poliovirus inactivado.

23. El método de las reivindicaciones 1 a 22, el cual comprende el paso adicional de mezclar uno o más antígenos a partir de un patógeno seleccionado de una lista que consiste en: *Haemophillus influenzae* b, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Neisseria meningitidis* tipo B, *Salmonella typhi*, y

hepatitis A, con toxoide de difteria, toxoide de tétanos, poliovirus inactivados tipos 1, 2, y/o 3, y opcionalmente el antígeno superficial de Hepatitis B, antes del ajuste del pH.

24. Un método para la elaboración de una vacuna de DTP, la cual está sustancialmente libre de tiomersal, y la cual comprende uno o más componentes de poliovirus seleccionados a partir del grupo que consiste en:

a. poliovirus inactivado tipo 1 en una dosis de 10 a 36 unidades de antígeno D, de 11 a 32 unidades de antígeno D, de 12 a 28 unidades de antígeno D, de 13 a 24 unidades de antígeno D, de 14 a 20 unidades de antígeno D, o de 15 a 19 unidades de antígeno D, o de alrededor o exactamente 18 unidades de antígeno D;

b. poliovirus inactivado tipo 2 en una dosis de 2 a 7 unidades de antígeno D, de 3 a 6 unidades de antígeno D, o de 4 a 5 unidades de antígeno D; y

c. poliovirus inactivado tipo 3, en una dosis de 8 a 29 unidades de antígeno D, de 9 a 26 unidades de antígeno D, de 10 a 23 unidades de antígeno D, de 11 a 20 unidades de antígeno D, de 12 a 17 unidades de antígeno D, o de 13 a 14 unidades de antígeno D;

el cual comprende los pasos de: mezclar toxoide de difteria y toxoide de tétanos, seguido por la adición de los componentes de poliovirus inactivado.

25. El método de la reivindicación 24, en donde la vacuna comprende poliovirus inactivado tipo 1 en una dosis de 10 a 36

unidades de antígeno D, de 11 a 32 unidades de antígeno D, de 12 a 28 unidades de antígeno D, de 13 a 24 unidades de antígeno D, de 14 a 20 unidades de antígeno D, o de 15 a 19 unidades de antígeno D, o alrededor o exactamente 18 unidades de antígeno D.

5 26. El método de la reivindicación 24 ó 25, en donde la vacuna comprende poliovirus inactivado tipo 2 en una dosis de 2 a 7 unidades de antígeno D, de 3 a 6 unidades de antígeno D, o de 4 a 5 unidades de antígeno D.

10 27. El método de las reivindicaciones 24 a 26, en donde la vacuna comprende poliovirus inactivado tipo 3 en una dosis de 8 a 29 unidades de antígeno D, de 9 a 26 unidades de antígeno D, de 10 a 23 unidades de antígeno D, de 11 a 20 unidades de antígeno D, de 12 a 17 unidades de antígeno D, o de 13 a 14 unidades de antígeno D.

15 28. El método de las reivindicaciones 1 a 27, en donde la vacuna comprende poliovirus inactivado tipo 1 adsorbido sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado, o en donde la
20 adsorción tiene lugar después de mezclar con el antígeno diferente del poliovirus inactivado).

 29. El método de la reivindicación 28, en donde el poliovirus inactivado tipo 1 se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

25 30. El método de las reivindicaciones 1 a 29, en donde la

vacuna comprende poliovirus inactivado tipo 2 adsorbido sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado, o bien
5 en donde la adsorción tiene lugar después de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado).

31. El método de la reivindicación 30, en donde el poliovirus inactivado tipo 2 se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

10 32. El método de las reivindicaciones 1 a 31, en donde la vacuna comprende poliovirus inactivado tipo 3 adsorbido sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado, o bien
15 en donde la adsorción tiene lugar después de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado).

33. El método de la reivindicación 32, en donde el poliovirus inactivado tipo 3 se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

20 34. El método de las reivindicaciones 1 a 33, en donde la vacuna comprende poliovirus inactivados tipos 1, 2, y 3, adsorbidos sobre una sal de aluminio (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes de mezclarse con el antígeno diferente del poliovirus inactivado, o bien en donde la adsorción tiene lugar después de la
25 mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado).

35. El método de las reivindicaciones a 1 a 34, en donde la vacuna comprende poliovirus inactivados tipos 1, 2, y 3 adsorbidos sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado, o bien en donde la adsorción tiene lugar después de la mezcla con el antígeno diferente del poliovirus inactivado).

36. El método de las reivindicaciones 1 a 35, en donde la vacuna comprende toxoide de difteria, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

37. El método de la reivindicación 36, en donde el toxoide de difteria se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

38. El método de las reivindicaciones 1 a 37, en donde la vacuna comprende toxoide de tétanos, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

39. El método de la reivindicación 38, en donde el toxoide de difteria se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

40. El método de las reivindicaciones 1 a 39, en donde la vacuna comprende *Bordetella pertussis* de células enteras muertas

(Pw), opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

5 41. El método de la reivindicación 40, en donde el Pw se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

 42. El método de la reivindicación 41, en donde el *Bordetella pertussis* de células enteras muertas se adsorbe sobre fosfato de aluminio (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después
10 de la mezcla con los otros antígenos).

 43. El método de la reivindicación 42, en donde el Pw se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

 44. El método de las reivindicaciones 1 a 43, en donde la vacuna comprende dos o más componentes de tosferina acelulares
15 (Pa) (por ejemplo, toxoide de tosferina (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN)), opcionalmente adsorbidos sobre hidróxido de aluminio, o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los antígenos diferentes de los antígenos
20 de tosferina acelulares).

 45. El método de la reivindicación 44, en donde el Pa se agrega después del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

 46. El método de la reivindicación 45, en donde los dos o más componentes de tosferina acelulares (Pa) se adsorben sobre
25 fosfato de aluminio (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o

después de la mezcla con los antígenos diferentes de los antígenos de tosferina acelulares).

47. El método de la reivindicación 46, en donde el Pa se agrega después del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

5 48. El método de las reivindicaciones 1 a 47, en donde la vacuna comprende antígeno superficial de Hepatitis B, opcionalmente adsorbido sobre fosfato de aluminio (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

10 49. El método de la reivindicación 48, en donde el antígeno superficial de Hepatitis B se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

50. El método de las reivindicaciones 1 a 49, en donde la vacuna comprende un conjugado de una proteína portadora y el
15 sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), opcionalmente adsorbido sobre fosfato de aluminio, o no adsorbido sobre un adyuvante (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

51. El método de la reivindicación 50, en donde el Hib se
20 agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

52. El método de las reivindicaciones 1 a 51, en donde la vacuna comprende uno o más conjugados de una proteína portadora, y un sacárido capsular de una bacteria seleccionada a partir del grupo de *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C,
25 *Neisseria meningitidis* tipo W, y *Neisseria meningitidis* tipo Y,

opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos, o no adsorbido sobre un adyuvante (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los antígenos diferentes de los antígenos de
5 sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* tipo A, C, W, ó Y).

53. El método de la reivindicación 52, en donde el uno o más conjugados de una proteína portadora y un sacárido capsular de una bacteria seleccionada a partir del grupo de *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, y
10 *Neisseria meningitidis* tipo Y, se agregan antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

54. El método de las reivindicaciones 1 a 53, en donde la vacuna comprende una vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis* tipo B (MenB), o lipo-oligosacárido, o un sacárido
15 capsular MenB conjugado, o un derivado del mismo, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos, o no adsorbido sobre un adyuvante (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los antígenos diferentes de los antígenos MenB).

20 55. El método de la reivindicación 55, en donde una vesícula de membrana externa de MenB o el lipo-oligosacárido, o el sacárido capsular de MenB conjugado, se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

25 56. El método de las reivindicaciones 1 a 55, en donde la vacuna comprende un sacárido de Vi a partir de *Salmonella typhi*

conjugado con una proteína portadora, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos, o no adsorbido sobre un adyuvante (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los
5 otros antígenos).

57. El método de la reivindicación 56, en donde el sacárido de Vi de *Salmonella typhi* conjugado con una proteína portadora, se agrega antes del paso de ajuste del pH de la reivindicación 20.

58. El método de las reivindicaciones 1 a 57, en donde la
10 vacuna comprende un antígeno a partir de Hepatitis A, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio, o sobre una mezcla de ambos (en donde la adsorción tiene lugar ya sea antes o después de la mezcla con los otros antígenos).

59. El método de la reivindicación 58, en donde el antígeno de Hepatitis A se agrega antes del paso de ajuste del pH de la
15 reivindicación 20.

60. El método de las reivindicaciones 1 a 59, en donde la vacuna comprende DT en una cantidad de 5 a 50 Lf, de 7 a 30 Lf, o
20 de aproximadamente o exactamente 7.5 Lf ó 25 Lf por dosis de 0.5 mililitros.

61. El método de las reivindicaciones 1 a 59, en donde la vacuna comprende DT en una cantidad de menos de 5 Lf, o de 1 a 4 Lf, o de aproximadamente o exactamente 2 Lf por dosis de 0.5
25 mililitros.

62. El método de las reivindicaciones 1 a 61, en donde la vacuna comprende TT en una cantidad de 2.5 a 30 Lf, de 3 a 20 Lf, o exactamente o aproximadamente 10 Lf por dosis de 0.5 mililitros.

5 63. El método de las reivindicaciones 1 a 62, en donde el Pa, si está presente en la vacuna, comprende PT en una cantidad de 2 a 50 microgramos, de 5 a 40 microgramos, de 10 a 30 microgramos, o exactamente o aproximadamente de 25 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

10 64. El método de las reivindicaciones 1 a 63, en donde la vacuna comprende el Pa que comprende PT en una cantidad de exactamente o aproximadamente 2.5 u 8 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

15 65. El método de las reivindicaciones 1 a 64, en donde la vacuna comprende el Pa que comprende FHA en una cantidad de 2 a 50 microgramos, de 5 a 40 microgramos, de 10 a 30 microgramos, o exactamente o aproximadamente 25 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

20 66. El método de las reivindicaciones 1 a 65, en donde la vacuna comprende el Pa que comprende FHA en una cantidad de exactamente o aproximadamente 2.5 u 8 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

25 67. El método de las reivindicaciones 1 a 66, en donde la vacuna comprende el Pa que comprende PRN en una cantidad de 0.5 a 20 microgramos, de 0.8 a 15 microgramos, de 2 a 10 microgramos, o de exactamente o aproximadamente 8 microgramos por dosis de

0.5 mililitros.

68. El método de las reivindicaciones 1 a 67, en donde la vacuna comprende el Pa que comprende PRN en una cantidad de exactamente o alrededor de 0.8 ó 2.5 microgramos por 0.5 mililitros.

5 69. El método de las reivindicaciones 1 a 68, en donde la vacuna comprende el Pw en una cantidad de 5 a 50 IOU, de 7 a 40 IOU, de 9 a 35 IOU, de 11 a 30 IOU, de 13 a 25 IOU, de 15 a 21 IOU, o alrededor o exactamente 20 IOU por dosis de 0.5 mililitros.

10 70. El método de las reivindicaciones 1 a 69, en donde la vacuna comprende HB en una cantidad de 5 a 20 microgramos, de 8 a 15 microgramos, o de aproximadamente o exactamente 10 microgramos por 0.5 mililitros.

15 71. El método de las reivindicaciones 1 a 70, en donde la vacuna comprende Hib en una cantidad de 5 a 20 microgramos, de 8 a 15 microgramos, o de aproximadamente o exactamente 10 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

20 72. El método de las reivindicaciones 1 a 70, en donde la vacuna comprende Hib en una cantidad de 1 a 60 microgramos, de 2 a 4 microgramos, o de alrededor o exactamente 2.5 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

73. El método de las reivindicaciones 1 a 72, el cual comprende un paso adicional de agregar un adyuvante.

25 74. El método de las reivindicaciones 1 a 73, en donde la vacuna comprende uno o más adyuvantes seleccionados a partir del grupo que consiste en: una sal de aluminio, tal como hidróxido de

aluminio o fosfato de aluminio, una sal de calcio, hierro o zinc, una suspensión insoluble de tirosina acilada o azúcares acilados, sacáridos catiónicamente o aniónicamente derivados, polifosfacenos, microesferas biodegradables, monofosforil-lípido A (MPL), derivados
5 de lípido A de toxicidad reducida, MPL 3-O-desacilado, quil A, saponina, QS21, tocol, AS-2, oligonucleótidos CpG, bioadhesivos, mucoadhesivos, micropartículas, liposomas, formulaciones de éter de polioxietileno, formulaciones de éster de polioxietileno, péptidos de muramilo, compuesto de imidazoquinolona, interleucinas, factor
10 estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF).

75. El método de la reivindicación 73, en donde el adyuvante es un inductor de TH1 preferencial.

15 76. El método de las reivindicaciones 1 a 75, en donde el contenido de aluminio total en la vacuna es de 200 a 1,000 microgramos, de 300 a 900 microgramos, de 400 a 800 microgramos, de 500 a 700 microgramos, o de alrededor o exactamente 630 microgramos de Al^{3+} por dosis de 0.5 mililitros.

20 77. El método de la reivindicación 76, en donde el contenido de Al^{3+} en la vacuna es todo de hidróxido de aluminio o todo de fosfato de aluminio.

78. El método de la reivindicación 76, en donde el contenido de Al^{3+} en la vacuna es una mezcla de hidróxido de aluminio y
25 fosfato de aluminio en la siguiente proporción: 1:8-8:1, 1:4-4:1, 3:8-

8:3, 1:2-2:1, ó 1:1 (peso:peso de $\text{Al}^{3+}:\text{Al}^{3+}$) de fosfato de aluminio:hidróxido de aluminio.

79. El método de la reivindicación 76, en donde el contenido de Al^{3+} en la vacuna es una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio en la siguiente proporción: 12:1-4:1, 11:1-5:1, 10:1-6:1, 9:1-7:1 u 8:1 (peso:peso de $\text{Al}^{3+}:\text{Al}^{3+}$) de fosfato de aluminio:hidróxido de aluminio.

80. El método de las reivindicaciones 1 a 79, el cual comprende el paso de agregar un adyuvante de sal de aluminio libre a la vacuna, en la cantidad de 0 a 300 microgramos, de 50 a 250 microgramos, de 75 a 200 microgramos, de 100 a 150 microgramos, o de alrededor o exactamente 115 microgramos de Al^{3+} por dosis de 0.5 mililitros.

81. El método de la reivindicación 80, en donde el adyuvante de sal de aluminio libre es todo de $\text{Al}(\text{OH})_3$ o todo de AlPO_4 .

82. El método de la reivindicación 80, en donde el adyuvante de sal de aluminio libre es una mezcla de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y AlPO_4 en la siguiente proporción (peso:peso de $\text{Al}^{3+}:\text{Al}^{3+}$): 1:1-1:6, 1:1.1-1:5, 1:1.2-1:4, 1:1.3-1:3, 1:1.4-1:2, por ejemplo 23/92 ó 69/46.

83. El método de la reivindicación 80, en donde el adyuvante de sal de aluminio libre es una mezcla de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y AlPO_4 en la siguiente proporción (peso:peso de $\text{Al}^{3+}:\text{Al}^{3+}$): 6:1-1:1, 5:1-1.1:1, 4:1-1.2:1, 3:1-1.3:1, 2:1-1.4:1, por ejemplo 46/69 ó 92/23.

84. El método de las reivindicaciones 80 a 83, en donde el adyuvante de sal de aluminio libre se agrega antes del paso de

ajuste del pH de la reivindicación 20.

85. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 84, en donde el poliovirus inactivado tipo 1, si está presente en la vacuna, es la cepa Mahoney.

5 86. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 85, en donde el poliovirus inactivado tipo 2, si está presente en la vacuna, es la cepa MEF-1.

10 87. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 86, en donde el poliovirus inactivado tipo 3, si está presente en la vacuna, es la cepa Saukett.

15

20

25

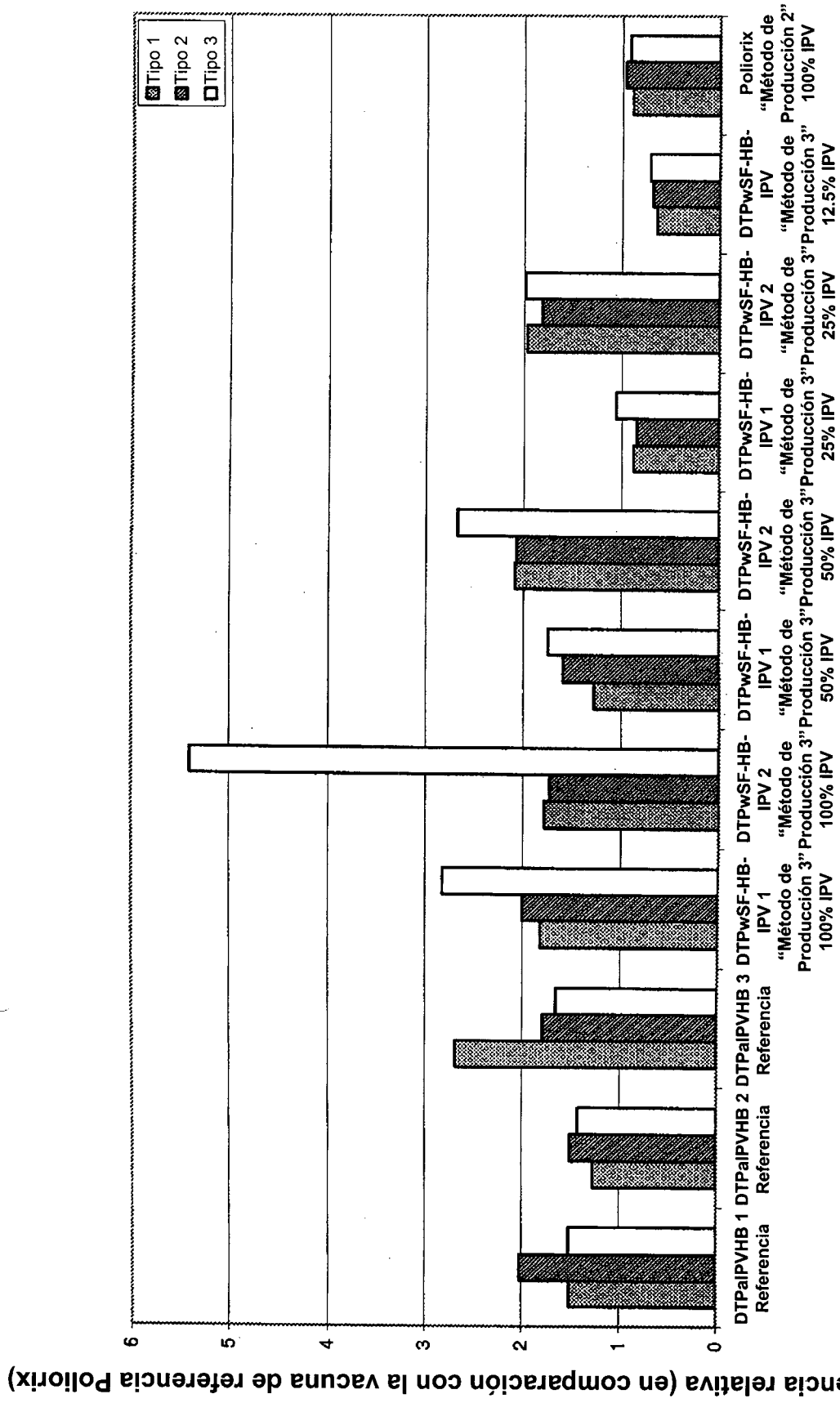


FIG. 1

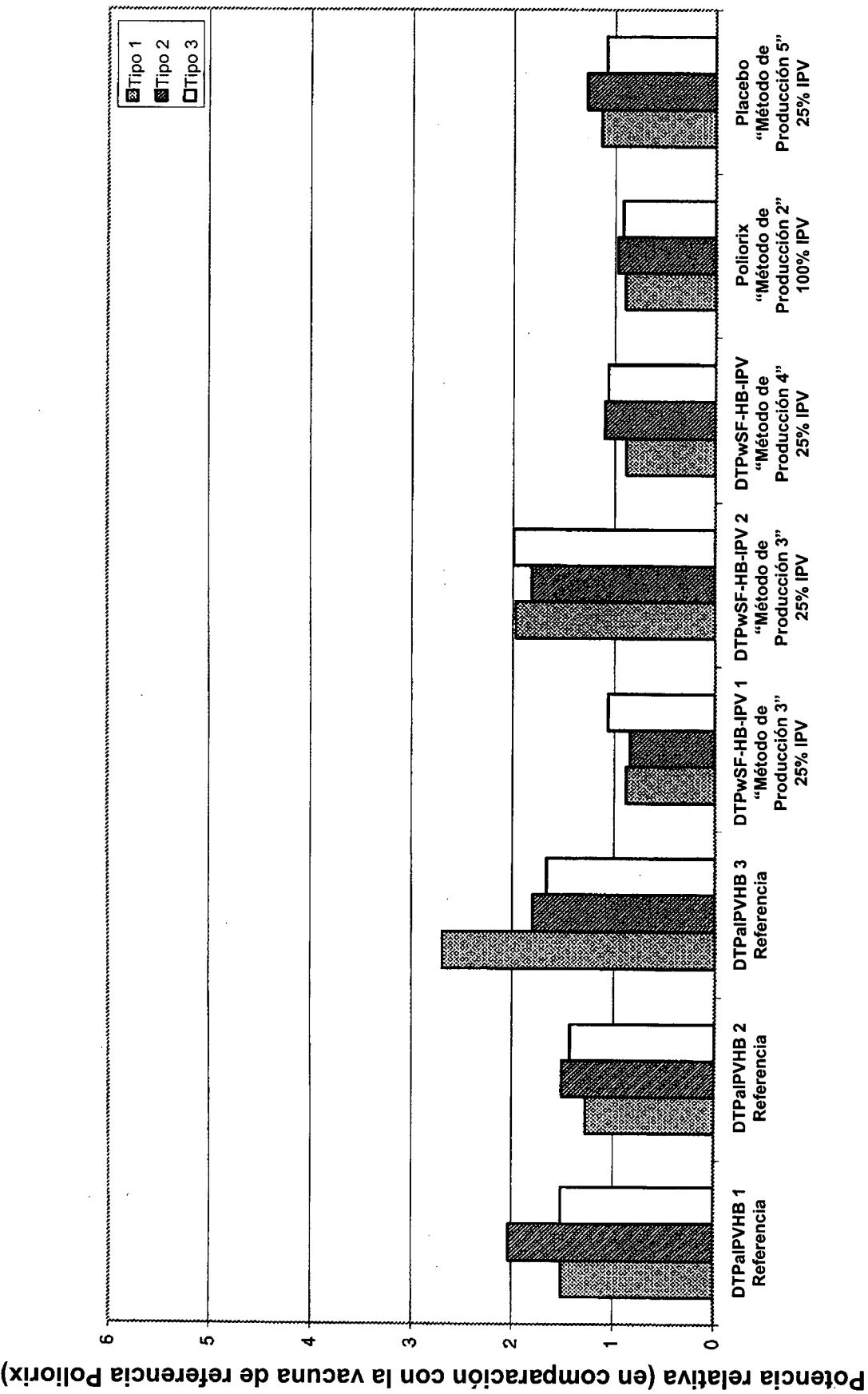
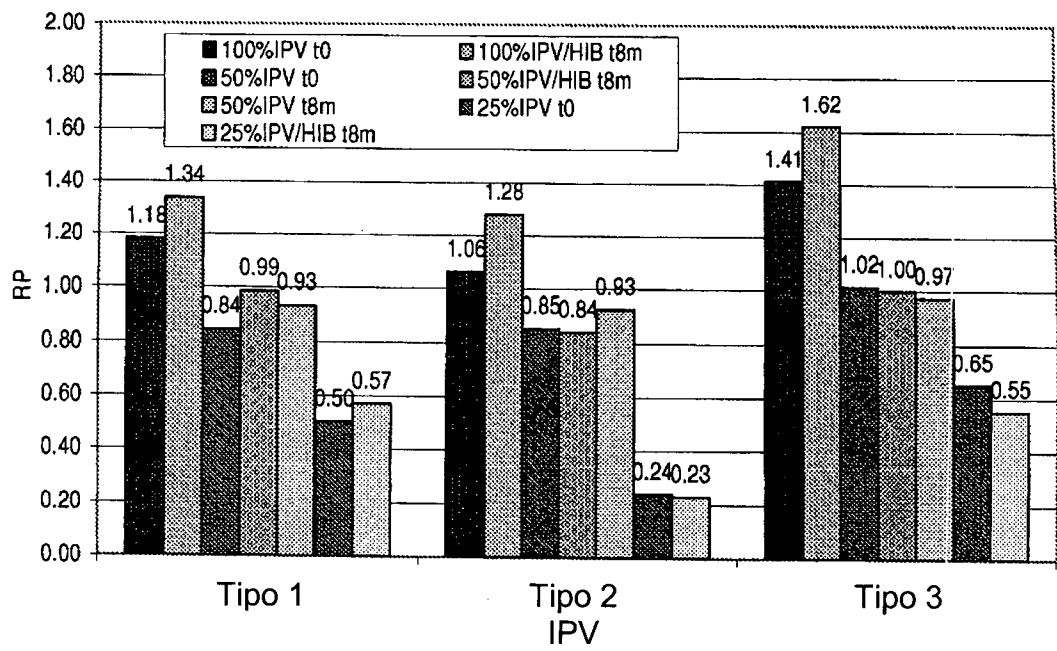


FIG. 2

a)



b)

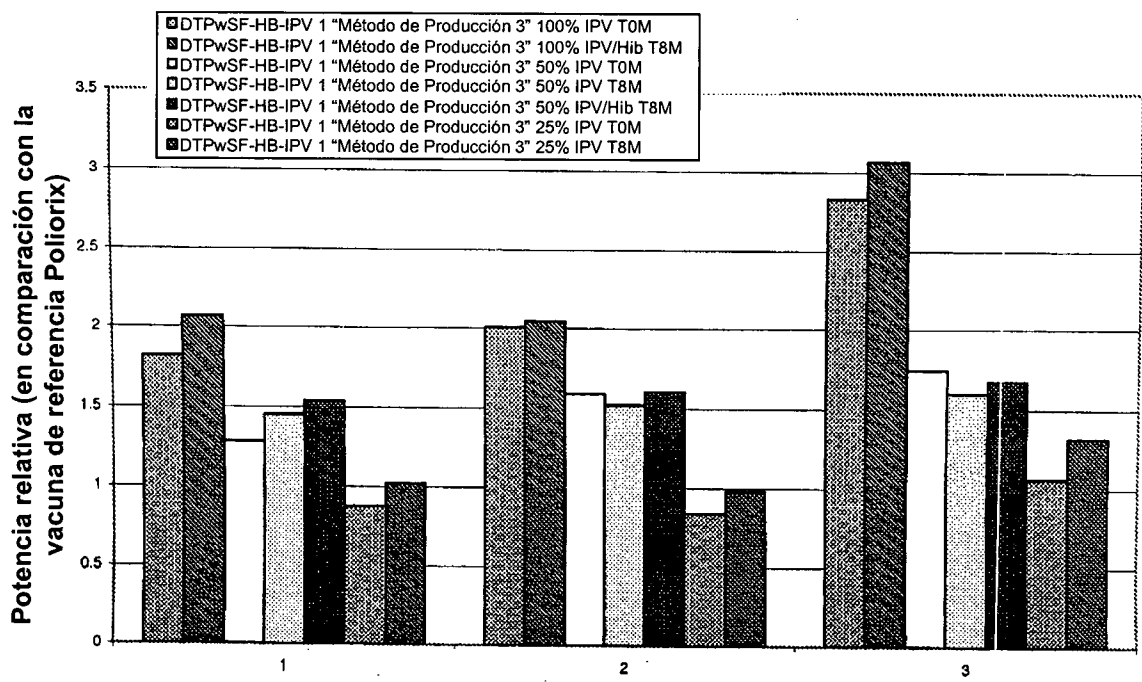


FIG. 3

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [x] MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 18
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 530
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 1910
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 20

COMPLETA ☒ INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

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

COMPLETA [] INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

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

COMPLETA [] INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha: SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-023294- -00000-0000

Fecha: 2009-03-06 15:41:36 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 193

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

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

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

REFERENCIA	Radicación No.	9 23294
	Solicitud internacional	PCT/EP2007/059391
	Fecha inicio fase nacional	07/04/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	

- - 10543

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

1. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular Única 5.2.9)

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

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

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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 17 SET. 2009
jfernand