

CSA716707



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-23296

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO **"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.

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-023296- -00000-0000

Fecha: 2009-03-06 15:43:44 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 178

FORMULARIO ÚNICO 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		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
	Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5°, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com		C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>39.690.713</u> TP <u>53.215</u>
③ REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DE HEMPTINNE, Herve; DUCHENE, Michel; MARY, Anne y SONVEAUX, Marc. Dirección: GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart. Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.		
④ INVENTOR(ES) (72)	Nombre: DE HEMPTINNE, Herve; DUCHENE, Michel; MARY, Anne y SONVEAUX, Marc. Dirección: GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart. Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.		
⑤ PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/EP2007/059390</u> Fecha: <u>07/09/07</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2008/028956 A1</u> Fecha: <u>13/03/08</u>			
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. <u>09-17,025</u> Fecha: <u>3 de Marzo de 2009</u>			

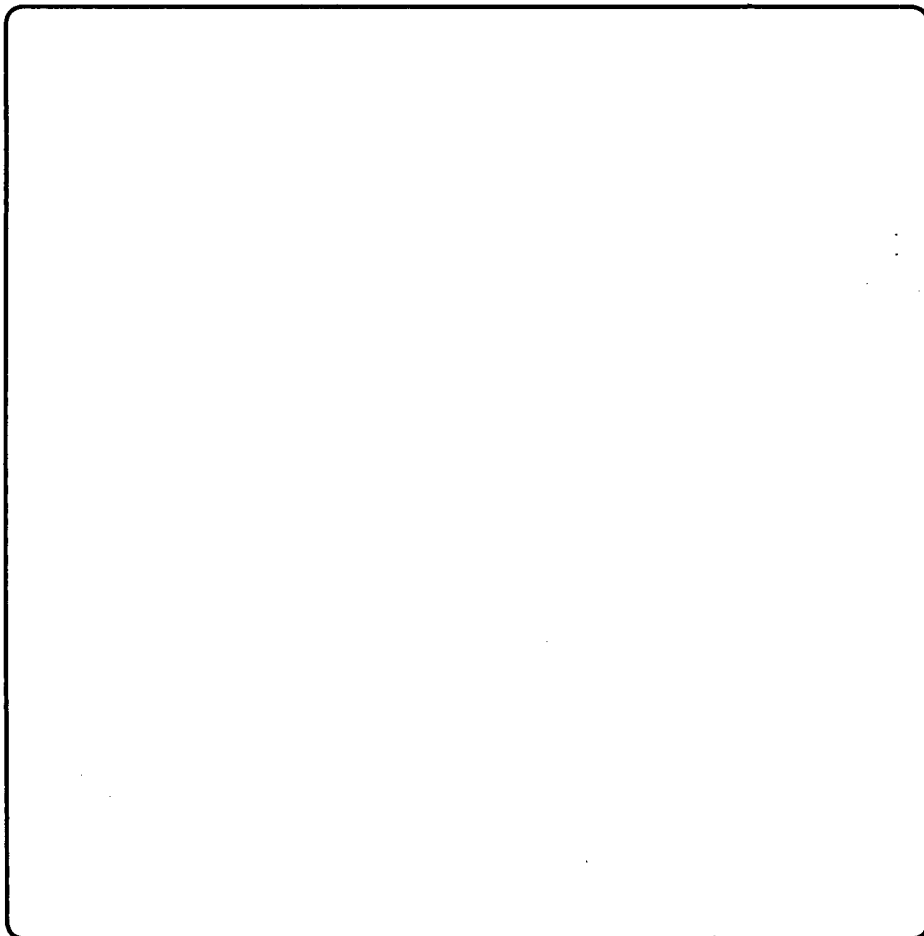
10

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, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional, publicación, copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad y la traducción de sus anexos.

11

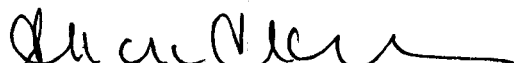
FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

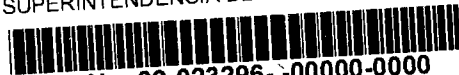
NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA: 

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-023296-00000-0000

Fecha: 2009-03-06 15:43:44 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 178

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 17,025
FECHA : MARZO 3 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

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

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	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

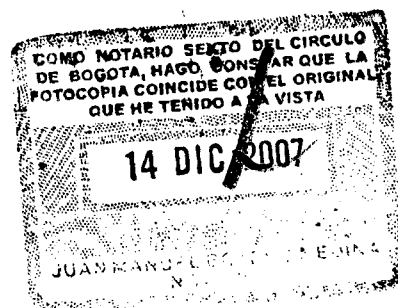
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

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


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

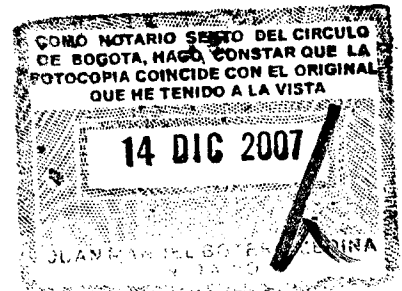
W. Glass
Por el Secretario de Estado

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

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

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



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;

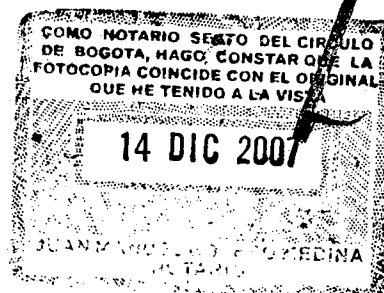
QUE el citado Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

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.

Handwritten signature

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



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

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

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

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

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

Dado y firmado

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

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

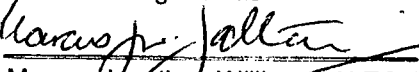
hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial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

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

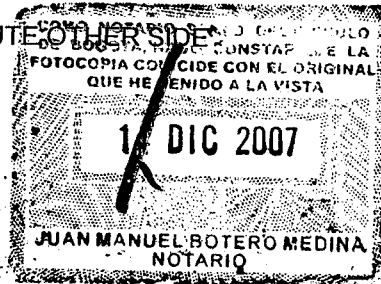
We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



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:

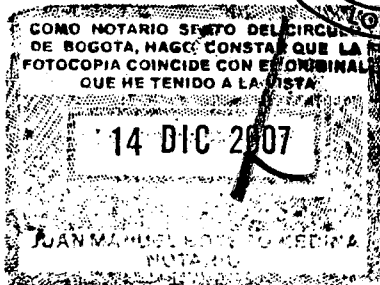


10. Signature:

W GLASS

W Glass

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



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

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

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

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

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

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en , con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

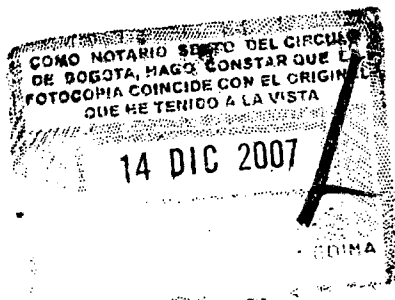
On this day of , 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

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

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

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

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



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 39/13	
(22) Fecha de solicitud: 06-03-09		(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 0617602.8 0625593.9	(32) Fecha 07-09-06 21-12-06	(33) País GB GB
		(72) Inventor(es): DE HEMPTINNE, Herve; DUCHENE, Michel; MARY, Anne y SONVEAUX, Marc.	
		(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 2008/028956 A1	
	No. de solicitud: PCT/EP2007/059390		
(54) Título:		VACUNA	

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Una vacuna de poliovirus inactivado, 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.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

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, Herve; 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

(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 2008/028956 A1**

No. de solicitud: **PCT/EP2007/059390**

(54) Título: **VACUNA**

10

(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, Herve; 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/EP2007/059390**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **13-03-08**

No. Publicación: **WO 2008/028956 A1**

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Titulo:

VACUNA

(57) Resumen:

Reivindicación número 1.-

Una vacuna de poliovirus inactivado, 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/059390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/13		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	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 page 5012, left-hand column, line 11 - line 14	9-16
Y	----- -/--	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. "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 December 2007		Date of mailing of the international search report 16/01/2008
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 Galli, Ivo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/059390

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
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	1-8
Y	-----	1-87
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	24-87
A	-----	13-16
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	24-87
A	-----	24-27
A	BEDFORD H. & ELLIMAN D.: "Misconceptions about the new combination vaccine" BRITISH MEDICAL JOURNAL, vol. 329, 2004, pages 411-412, XP002463165 page 411, right-hand column, line 13 - line 15	1-87
A	-----	
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	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/059390

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

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

Although claims 60-62 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-8, partly 17-23, 28-87

An IPV vaccine comprising inactivated poliovirus type 1 at a dose greater than 10 D-antigen units and less than 20 D-antigen units. Uses and kits thereof.

2. claims: 9-16, and partly 17-23, 28-87

An IPV vaccine comprising inactivated poliovirus type 3 at a dose greater than 8 D-antigen units and less than 20 D-antigen units. Uses and kits thereof.

3. claims: partly 24-87

An IPV vaccine comprising inactivated poliovirus type 1 at a dose greater than 10 D-antigen units and less than 36 D-antigen units, without any thiomersal. Uses and kits thereof.

4. claims: partly 24-87

An IPV vaccine comprising inactivated poliovirus type 2 at a dose greater than 2 D-antigen units and less than 7 D-antigen units, without any thiomersal. Uses and kits thereof.

5. claims: partly 24-87

An IPV vaccine comprising inactivated poliovirus type 3 at a dose greater than 8 D-antigen units and less than 29 D-antigen units, without any thiomersal. Uses and kits thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/059390

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 2008/028956 A1

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

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

(21) International Application Number:
PCT/EP2007/059390

(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

(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.

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

(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).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DE HEMPTINNE, Herve [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).

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



WO 2008/028956 A1

(54) Title: VACCINE

(57) Abstract: The standard dose of polio vaccines contains 40 D-antigen units of inactivated poliovirus type 1 (Mahoney), 8 D-antigen units of inactivated poliovirus type 2 (MEF-1), and 32 D-antigens units of inactivated poliovirus type 3 (Saukett). The present invention teaches that reduced doses of inactivated poliovirus can maintain an adequate or improved level of protection against polio.

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

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna de poliovirus inactivado, la cual comprende:
 - (a) toxoide de difteria;
 - 5 (b) toxoide de tétanos;
 - (c) *Bordetella pertussis* de células enteras muertas, sustancialmente libre de tiomersal; o dos o más componentes de tosferina acelulares (Pa) (por ejemplo, toxoide de tosferina (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), y pertactina (PRN)); y
 - 10 (d) poliovirus inactivado tipo 1 en una dosis mayor de 10 unidades de antígeno D y menos de 20 unidades de antígeno D.
2. La vacuna de la reivindicación 1, en donde el poliovirus inactivado tipo 1 está presente 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
15 una dosis estándar de 40 unidades de antígeno D.
3. La vacuna de la reivindicación 1 ó 2, la cual 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
20 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. La vacuna de la reivindicación 3, en donde el poliovirus inactivado tipo 3 está en una dosis mayor de 8 y menor de 20
25 unidades de antígeno D.

5. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 4, la cual comprende adicionalmente el poliovirus inactivado tipo 2 en una dosis de 2 a 4 unidades de antígeno D.

6. La vacuna de la reivindicación 5, en donde el poliovirus inactivado tipo 2 está presente en una dosis mayor de 2 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. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el toxoide de difteria es adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

8. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el toxoide de tétanos es adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

9. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el *Bordetella pertussis* de células enteras muertas es adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

10. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 9, en donde los dos o más componentes de tosferina acelulares (Pa) (por ejemplo, toxoide de tosferina (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), y pertactina (PRN)), son adsorbidos sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

11. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 10, la cual comprende el poliovirus inactivado tipo 1 adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de

ambos.

12. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 11, la cual comprende el poliovirus inactivado tipo 2 adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de
5 ambos.

13. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 12, la cual comprende el poliovirus inactivado tipo 3 adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de
ambos.

10 14. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 13, la cual comprende los poliovirus inactivados tipos 1, 2, y 3, adsorbidos sobre una sal de aluminio.

15 15. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 14, la cual comprende los poliovirus inactivados tipos 1, 2, y 3, adsorbidos sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una
mezcla de ambos.

20 16. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 15, la cual comprende adicionalmente el antígeno superficial de Hepatitis B, sustancialmente libre de tiomersal, opcionalmente adsorbido sobre fosfato de aluminio.

25 17. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 16, la cual comprende adicionalmente 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.

18. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 17, la cual comprende adicionalmente 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 adsorbidos sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos, o no adsorbido sobre un adyuvante.

19. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 18, la cual comprende adicionalmente una vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis* tipo B (MenB) o lipo-oligosacárido o un sacárido capsular MenB conjugado, o un derivado de los mismos, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos, o no adsorbido sobre un adyuvante.

20. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 19, la cual comprende adicionalmente un sacárido Vi 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.

21. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 20, la cual comprende adicionalmente un antígeno de Hepatitis A, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

22. Un método para prevenir o tratar una infección por poliovirus, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria*, y *Bordetella pertussis*, mediante la administración de la vacuna de las reivindicaciones 1 a 21 a un ser humano que lo necesite.

5 23. Un método para prevenir o tratar una infección por poliovirus, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria*, y *Bordetella pertussis*, y opcionalmente una o más de infección por Hepatitis B, *Haemophilus influenzae b*, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W,
10 *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Neisseria meningitidis* tipo B, *Salmonella typhi*, y Hepatitis A, mediante la administración de la vacuna de las reivindicaciones 1 a 21.

24. El uso de la vacuna de las reivindicaciones 1 a 21, en la fabricación de un medicamento para la prevención de una
15 enfermedad causada por poliovirus, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria*, y/o *Bordetella pertussis*.

25. El uso de la vacuna de las reivindicaciones 1 a 21, en la fabricación de un medicamento para la prevención de una enfermedad causada por poliovirus, *Clostridium tetani*,
20 *Corynebacterium diphtheria*, y *Bordetella pertussis*, y opcionalmente por una o más de Hepatitis B, *Haemophilus 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.

26. La vacuna, el método, o el uso de las reivindicaciones 1 a 25, en donde el poliovirus inactivado tipo 1 es a partir de la cepa Mahoney.

5 27. La vacuna, el método, o el uso de las reivindicaciones 1 a 26, en donde el poliovirus inactivado tipo 2, si está presente, es a partir de la cepa MEF-1.

28. La vacuna, el método, o el uso de las reivindicaciones 1 a 27, en donde el poliovirus inactivado tipo 3, si está presente, es a partir de la cepa Saukett.

10

15

20

25

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:		GlaxoSmithKline Corporate IP Received BRENTFORD 24 SEP 2008		NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (PCT Rule 71.1)	
GLAXOSmithKline, C.I.P. 980 Great West Road Brentford, Middlesex TW8 9GS GRANDE BRETAGNE					
ATTY: <u>EKB/WH</u> <u>ADMIN</u> <u>7/11/08</u> IPM: <u>N/A</u> <u>ON</u> <u>UPDATED</u> <u>ON</u>		Date of mailing (day/month/year)		19.09.2008	
Applicant's or agent's file reference EKB/VB62122		ATTY CHECKED/FILE <u>m</u>		IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No. PCT/EP2007/059390		International filing date (day/month/year) 07.09.2007		Priority date (day/month/year) 07.09.2006	
Applicant GLAXO SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.					

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 - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Authorized Officer Wallentin, Marko Tel. +31 70 340-3991	
---	--	---

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/VB62122		FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEAA16
International application No. PCT/EP2007/059390		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>9</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>4</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 2008-07-07		Date of completion of this report 19.09.2008		
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016		Authorized officer Galli, Ivo Telephone No. +31 70 340-3726 		

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2007/059390

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

1-28 received on 18.08.2008 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. 29-87
- ☐ 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/EP2007/059390

Box No. II Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
 - ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66.7(a)).
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66.7(b)).
2. ☒ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rule 64.1). Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:
see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2007/059390

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

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

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 22-23

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 22-23 (IA only) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

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

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2007/059390

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation to restrict or pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☒ restricted the claims.
 - ☐ paid additional fees.
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee.
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid.
 - ☐ neither restricted the claims nor paid additional fees.
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is:
- ☒ complied with.
 - ☐ not complied with for the following reasons:
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos. .

Box No. V Reasoned statement under 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>1-28</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-28</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-21, 24-28</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2007/059390

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

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

International application No.

PCT/EP2007/059390

Re Item II: Priority

1. The Examples founds in the priority documents of 07.09.2006 (GB 0617602) and of 21.12.2006 (GB 0625593) disclose subject-matter in large part different from that disclosed in the Examples of the application as filed.

Re Item III: Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

2. Claims 22-23 concern a method of treatment of the human/animal body. This International Preliminary Examination Authority does not provide opinions on the industrial applicability of such methods, since the standards vary according to the different PCT jurisdictions.

Re Item IV: Lack of unity of invention

3. The present set of claims is restricted to a DTP-Polio combination vaccines, wherein the Polio component is at low dose and the vaccine is thiomersal free. The unity of the subject-matter can be recognized, even if the revised claims do not entirely reflect it.

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

4. D4 (WO9800167) discloses composite vaccines (DTP-IPV-HiB) which do not contain thiomersal. The amounts of polio components are:

- IPV1 at 20-50 Du¹ (preferred dose: 40 Du)

¹"D-antigen units"

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

International application No.

PCT/EP2007/059390

- IPV2 at 5-10 Du (preferred dose: 8 Du) and
- IPV3 at 20-50 Du (preferred dose: 32 Du).

5. The present independent claim 1 is limited to a DTP-IPV composition, wherein the dose of IPV1 is 10-20 Du, i.e. a low dose. Claim 1 is novel.
6. In view of prior art, the problem to be solved is to provide an alternative DTP-IPV dosage, and the solution proposed is to use a low dose of IPV (10-20 Du).
7. In prior art there is no effective suggestion that a low dose of IPV can or should be used:

		IPV type 1 (Du)	IPV type 2 (Du)	IPV type 3 (Du)
D1 Herremans	disclosed	40	4	7.5
D2 Doi	disclosed	11		
D3 Dragunsky	disclosed		1, 4	
D4 WO9800167	claimed	20-50	5-10	20-50
	preferred	40	8	32
D6 WO2004/039399	claimed	20-80	5-10	20-64
	preferred	40	8	32
	preferred	80	16	64

8. D1, D3, D4, D6 do not concern DTP-IPV vaccines, and all foresee the use of the conventional doses of IPV-1 (20-50). Only D2, in a control experiment (Fig 3) discloses incidentally the use of 11 Du of IPV-1, though it provides no rationale (let alone an incentive) for using low doses of IPV-1 in IPV vaccines, particularly in

combination vaccines for use in humans. It follows that independent claim 1 is inventive.

9. Consequently, all of the dependent claims 2-21, as well as the related claims 22-28, are novel and inventive.

Re Item VIII: Certain observations on the international application

10. Claim 1, limb (c) refers to the presence of:

- either killed *B. pertussis*, without thiomersal, or
- other pertussis antigens -- but without specifying whether or not thiomersal is present.

11. D5 (Bedford) teaches that it is impossible to have thiomersal in a vaccine that includes IPV, because thiomersal inactivates it. Therefore, whatever the antigen used for pertussis, the vaccines cannot contain thiomersal. Thus:

- If the other antigens to which claim 1 refers can be used in the absence of thiomersal, then this limb of the claim should be clarified.
- If some or all of the other antigens to which claim 1 refers cannot be used in the absence of thiomersal, then they are unsuitable for a vaccine in combination with IPV, and should be excluded from the ambit of the claim in conformity with the requirements of support and disclosure.

18. 08. 2008

Claims

(81)

1. An IPV vaccine comprising:
 - (a) diphtheria toxoid;
 - (b) tetanus toxoid;
 - (c) killed whole-cell *Bordetella pertussis*, substantially thiomersal free; or two or more acellular pertussis components (Pa) (e.g. pertussis toxoid (PT), filamentous haemagglutinin (FHA) and pertactin (PRN)), and;
 - (d) inactivated poliovirus type 1 at a dose greater than 10 D-antigen units and less than 20 D-antigen units.
2. The vaccine of claim 1, wherein the inactivated poliovirus type 1 is present at 26-49%, 30-45%, 33-40%, or 35-37% of a standard 40 D-antigen unit dose.
3. The vaccine of claim 1 or 2, additionally comprising 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 vaccine of claim 3, wherein the inactivated poliovirus type 3 is at a dose of greater than 8 and less than 20 D-antigen units.
5. The vaccine of claims 1-4, additionally comprising inactivated poliovirus type 2 at a dose of 2-4 D-antigen units.
6. The vaccine of claim 5, wherein the inactivated poliovirus type 2 is present 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 vaccine of claims 1-6, wherein the diphtheria toxoid is adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both.
8. The vaccine of claims 1-7, wherein the tetanus toxoid is adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both.

AMENDED SHEET

9. The vaccine of claims 1-8, wherein the killed whole-cell *Bordetella pertussis* is adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both.
10. The vaccine of claims 1-9, wherein the two or more acellular pertussis components (Pa) (e.g. pertussis toxoid (PT), filamentous haemagglutinin (FHA) and pertactin (PRN)) are adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both.
11. The vaccine of claims 1-10, which comprises inactivated poliovirus type 1 adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both.
12. The vaccine of claims 1-11, which comprises inactivated poliovirus type 2 adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both.
13. The vaccine of claims 1-12, which comprises inactivated poliovirus type 3 adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both.
14. The vaccine of claims 1-13, which comprises IPV types 1, 2 and 3 adsorbed onto an aluminium salt.
15. The vaccine of claims 1-14, which comprises IPV types 1, 2 and 3 adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both.
16. The vaccine of claims 1-15, additionally comprising Hepatitis B surface antigen, substantially thiomersal free, optionally adsorbed onto aluminium phosphate.
17. The vaccine of claims 1-16, additionally comprising 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.
18. The vaccine of claims 1-17, additionally comprising one or more conjugates of a carrier protein and a capsular saccharide of a bacterium selected from the group

AMENDED SHEET

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.

19. The vaccine of claims 1-18, additionally comprising 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.

20. The vaccine of claims 1-19, additionally comprising 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.

21. The vaccine of claims 1-20, additionally comprising an antigen from Hepatitis A, optionally adsorbed onto aluminium hydroxide or aluminium phosphate or a mixture of both.

22. A method of preventing or treating poliovirus infection, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria* and *Bordetella pertussis* infection by administering the vaccine of claims 1-21 to a human in need thereof.

23. A method of preventing or treating poliovirus, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria* and *Bordetella pertussis* infection and optionally one or more of Hepatitis B, *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 infection by administering the vaccine of claims 1-21.

24. The use of the vaccine of claims 1-21 in the manufacture of a medicament for the prevention of disease caused by poliovirus, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria* and *Bordetella pertussis*.

AMENDED SHEET

25. The use of the vaccine of claims 1-21 in the manufacture of a medicament for the prevention of disease caused by poliovirus, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria* and *Bordetella pertussis* and optionally one or more of Hepatitis B, *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.

26. The vaccine, method or use of claims 1-25, wherein IPV type 1, is from the Mahoney strain.

27. The vaccine, method or use of claims 1-26, wherein IPV type 2, if present, is from the MEF-1 strain.

28. The vaccine, method or use of claims 1-27, wherein IPV type 3, if present, is from the Saukett strain.

AMENDED SHEET

VACUNA

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 La dosis estándar de las vacunas de polio contiene 40 unidades de antígeno-D del poliovirus inactivado tipo 1 (Mahoney), 8 unidades de antígeno-D del poliovirus inactivado tipo 2 (MEF-1), y 32 unidades de antígeno-D del poliovirus inactivado tipo 3 (Saukett). La presente invención enseña que las dosis reducidas del poliovirus inactivado pueden mantener un nivel adecuado o mejorado de protección contra la polio.

10

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, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Números WO
25

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
5 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
10 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.

15 **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
20 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
25 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 tipo 2, y 32 unidades de antígeno D de poliovirus inactivado tipo 3
10 (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 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 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
15 20 30 al 45 por ciento, del 33 al 40 por ciento, del 35 al 37 por ciento, o
25

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.

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.

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

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-HepB. En el pasado se ha utilizado el tiomersal en la preparación de
10 *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

JA

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

61

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, 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.

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 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 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 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 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 esteroide (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.

68

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 epítopos de células-T CD4⁺

A

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.

75

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 isoelectrico (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 isoelectrico 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 Al(OH)_3 ó AlPO_4 , el Pw puede ser adsorbido sobre, o se puede mezclar con, AlPO_4 , la pertactina puede ser adsorbida sobre Al(OH)_3 ; la hemaglutinina filamentosa puede ser adsorbida sobre Al(OH)_3 ; el toxoide de
5 toserina puede ser adsorbido sobre Al(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 Al(OH)_3 ó AlPO_4 , o pueden no ser adsorbidos, el componente MenB puede ser adsorbido sobre Al(OH)_3 ó AlPO_4 , o puede no ser
10 adsorbido; Vi puede ser adsorbido sobre Al(OH)_3 ó AlPO_4 , o puede no ser adsorbido; HepA puede ser adsorbido sobre Al(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 15 ciento en agua), y Adjuphos (fosfato de aluminio, suspensión al 2 por 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 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 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, 20^a Edición, ISBN:0683306472.

Las composiciones de la invención se pueden liofilizar, o 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 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 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.

82

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

83

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
10 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
15 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.

20 Formulaciones de vacunas

 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
25 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 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
10 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
15 titulación media geométrica obtenida con la vacuna conocida Poliorix®. Típicamente, la prueba de potencia relativa se lleva a
20 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

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 empacar 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*,
10 *Corynebacterium diphtheriae*, y opcionalmente uno o más de 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) toxoide de difteria (DT ó D) (véase anteriormente),
(c) toxoide 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.

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

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

20 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 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 antígeno/antígeno. De esta manera, se pueden alcanzar estas metas

25

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.

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.

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.

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.

94

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

95

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

97

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, 5 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 10 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 15 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 20 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 25 colaboradores, 1998, APMIS, 106:800). Se ha reportado la

100

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.

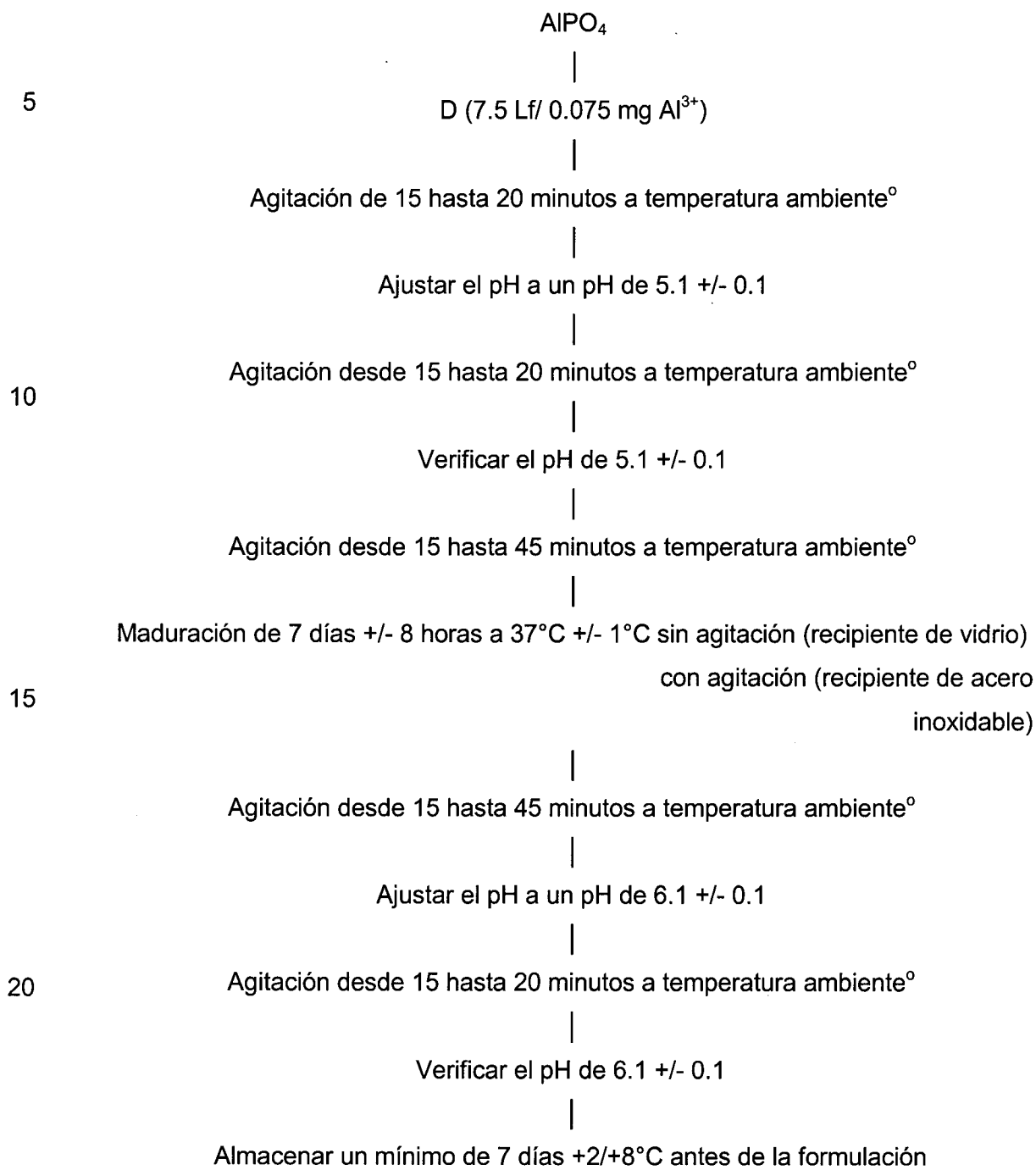


Tabla 1

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

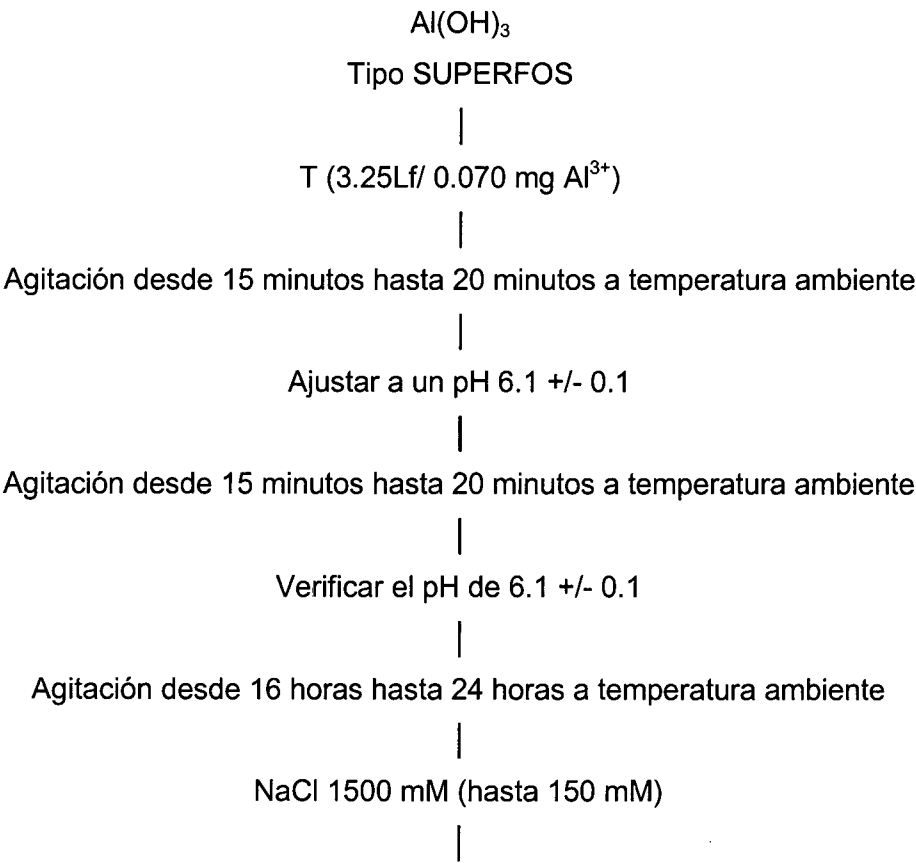
5

10

15

20

25



104

Agitación desde 15 minutos hasta 45 minutos a temperatura ambiente



Ajustar a un pH de 6.1 +/- 0.1



Agitación desde 15 minutos hasta 20 minutos a temperatura ambiente



Verificar el pH de 6.1 +/- 0.1



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

Tabla 2

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

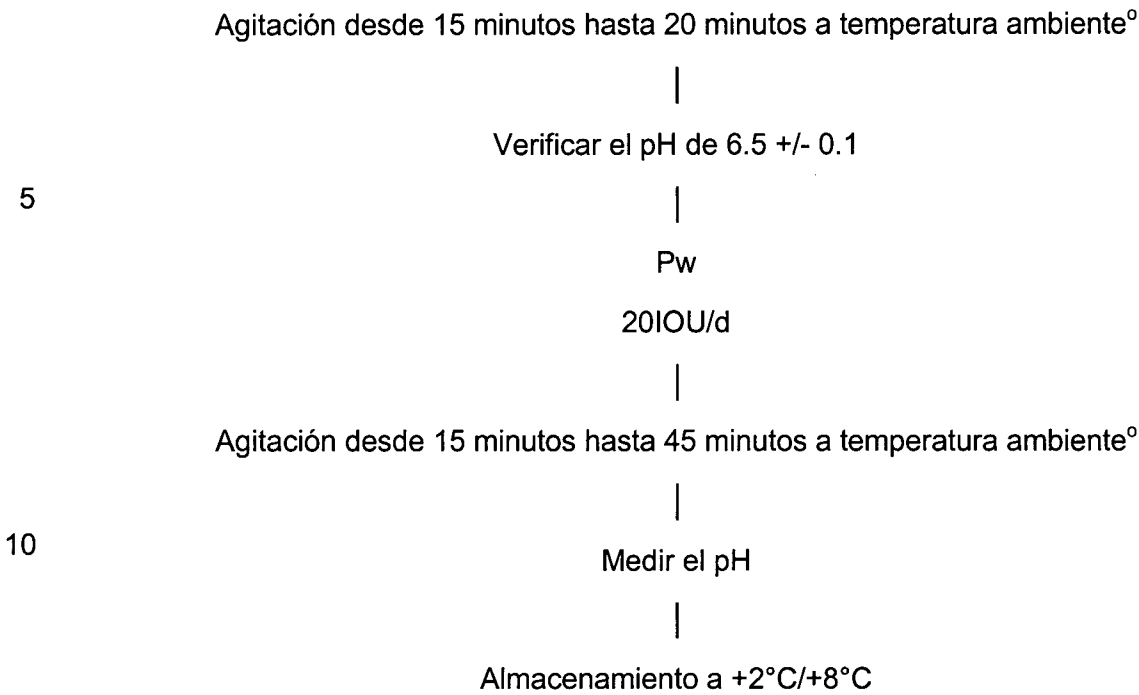
AlPO₄

0.17 mg Al³⁺/d (Brenntag)



Ajustar el pH a un pH de 6.5 +/- 0.1





15

Tabla 3

Método de producción para adsorción de Pw

20

25

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

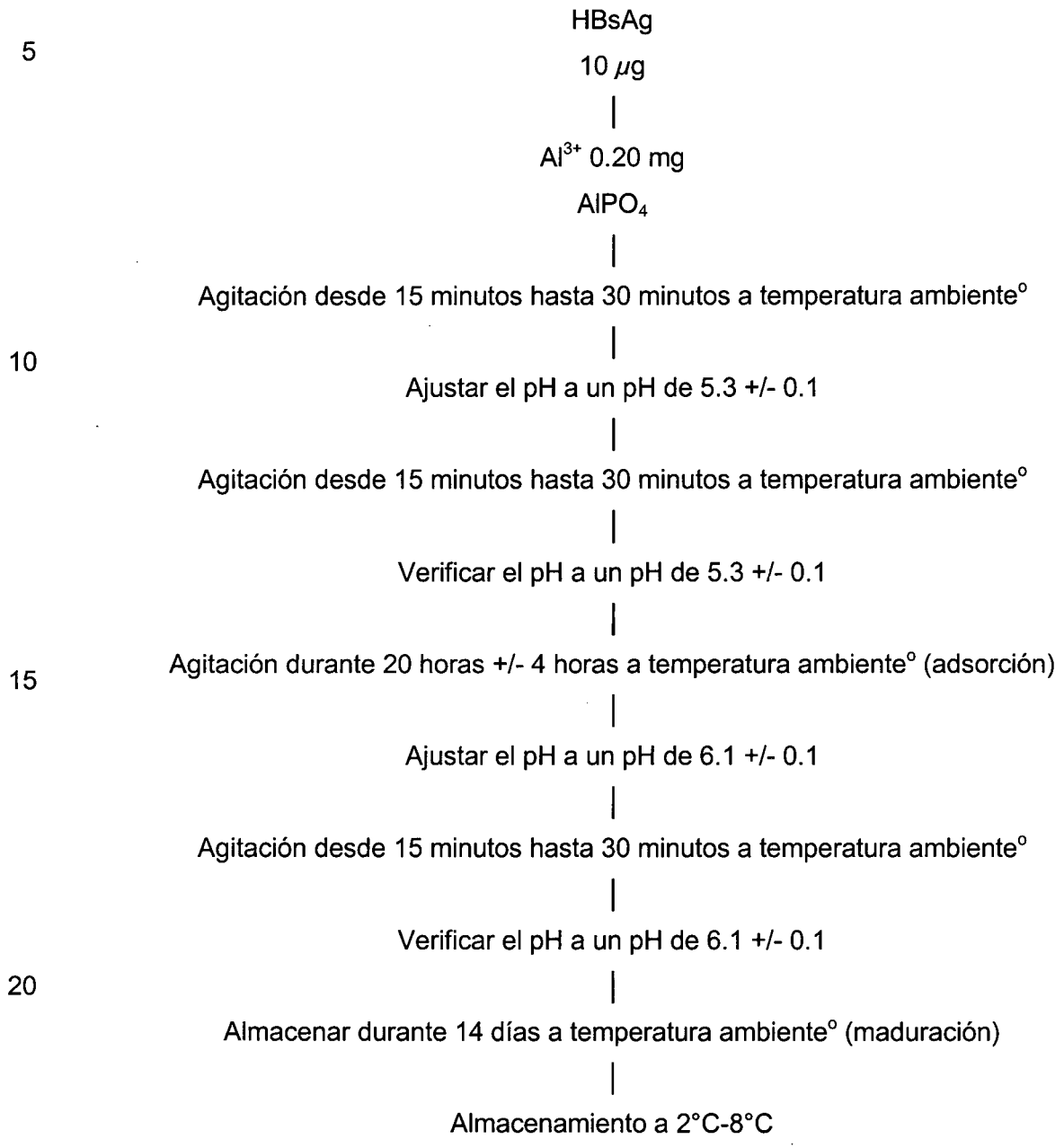


Tabla 4

Método de producción para adsorción de HBsAg

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

Se probaron varias formulaciones diferentes:

- Una combinación de toxoide de difteria, toxoide de
15 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.
20 (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
25 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	

MD

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 .

AAA

5

10

15

20

25

Paso	Método de producción 3: DTPw _{SF} -HB-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 3: DTPw _{SF} -HB-IPV		
	Paso	Método de producción 4: DTPw _{SF} -HB-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.		
25	8	Agregar 7.5 Lf de toxoide de difteria adsorbido.		

113

Paso	Método de producción 3: DTPw _{SF} -HB-IPV
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.

Tabla 5. Método de producción por dosis de 0.5 mililitros

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).

Para la formulación del método de producción 1: HBsAg, D, y T se adsorben por separado sobre AlPO_4 , AlPO_4 , y $\text{Al}(\text{OH})_3$, respectivamente. Los tres antígenos se agregan en secuencia a una suspensión que contiene agua, NaCl, y AlPO_4 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.

Para la formulación del método de producción 3, los tres antígenos adsorbidos se agregan en secuencia a una suspensión que

contiene agua, NaCl, y AlPO_4 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
10 previamente adsorbido, y la mezcla se agita entonces durante 60 a 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
15 involucró un paso de agitación. Durante el proceso de fabricación de 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

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(O H) ₃ libre	Dosis de toxoide de difteria	Dosis de toxoide de tétanos	Dosis de tosferina	Dosis de HBsAg	Dosis de IPV	
											% de dosis estándar	Unidades de antígeno D (*) (T1/T2/T3)
Método de producción 1 DTPw _{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% 50% 25% 12.50%	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4
Método de producción 3 DTPw _{SF} -HB- IPV	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	NA	7.5 Lf	3.25 Lf	20IOU	10 µg	100% 50% 25% 12.50%	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4
Método de producción 4 DTPw _{SF} -HB- IPV	75 µg	70 µg	200 µg	170 µg	115 µg	NA	7.5 Lf	3.25 Lf	20IOU	10 µg	100% 50% 25% 12.50%	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4
Método de producción 5 Placebo	NA	NA	NA	NA	560 µg	70 µg	NA	NA	NA	NA	100% 50% 25% 12.50%	40/8/32 20/4/16 10/2/8 5/1/4

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

116

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.

La presencia de los anticuerpos contra la poliomielitis 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.

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 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}) mediante el análisis probit. La ED_{50} se expresó en unidades de antígenos D.

Con el objeto de cuantificar la potencia en relación con aquella de la vacuna de referencia (usualmente Poliorix®, pero también puede ser una vacuna de DTPaHBIPV, tal como Pediarix®), se midió 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.

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.

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 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 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 preestablecido 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
15 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

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 contiene el 12.5 por ciento de poliovirus inactivado).

Tabla 9

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)
DTPaIPVHB Referencia	82%	NP	99%	NP	93%	NP
DTPw _{SF} - HB-IPV 1 "Método de producción 3" 100% IPV	48%	47%	94%	<5%	24%	74%
DTPw _{SF} - HB-IPV 2 "Método de	80%	<5%	100%	<5.0%	81%	17%

	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)
5							
	producción 3" 100% IPV						
10	DTPw _{SF} - HB-IPV 1 "Método de producción 3" 50% IPV	48%	31%	98%	<5%	29%	64%
15	DTPw _{SF} - HB-IPV 2 "Método de producción 3" 50% IPV	71%	<5%	99%	<5%	91%	>5%
20	DTPw _{SF} - HB-IPV 1 "Método de producción 3" 25% IPV	54%	34%	115%	<5%	33%	71%
25	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%

5

10

15

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%

20

25

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.

La 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

135

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.

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.

Tabla 12
Porcentaje de desorción de toxoide de D en DTPwHB-IPV con el intervalo de dosis del 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%	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

10

15

20

IPV		Estimación de Ag no adsorbido					
		PROPORCIÓN DE Al(OH) ₃ /AlPO ₄					
		0/115		23/92		46/69	
Dosis	Tipo	T0	21d25°C	T0	21d25°C	T0	21d25°C
0%	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	ACUMULACIÓN	
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%
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%
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 Al(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 Al(OH)₃/AlPO₄ de 46/69.

138

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.
- 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.

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 Proporción 46/69	<1.59	0.46	<1.67
DTPw-HB-IPV 25%/HIB	3.08	0.96	3.25

5

Muestra	ED ₅₀		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Proporción 46/69			
Tetravac	8.53	0.39	9.15
Poliorix	9.52	2.64	15.06
DTPaHBIPV	<5.18	<0.64	15.01

10

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).

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

20

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.

25

- **Indicación/Poblaciones:**

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:

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

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

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

10 Vacunas de DTPw-HBV/Hib + IPV.

• **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.

15 ✓ Demostrar la no inferioridad de la vacuna de DTPw-HBV-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.

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 (dosis estándar)/Hib) en términos de índices de seroprotección para cada uno de los tres tipos de poliovirus es de ≤ 10 por ciento.*

25 ✓ 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.

- 5 *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 ≤ 10 por ciento.

- ✓ 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
- 15 de poliovirus, un mes después del curso de vacunación primaria.

- 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*
- 20 ≤ 10 por ciento.

• **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
- 25

vacuna, en comparación con las vacunas de DTPw-HBV/Hib y de IPV co-administradas.

Reactogenicidad

5 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**

10 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.

15 • **Formulaciones de Vacuna:**

Tabla 16

Formulaciones de vacunas

20

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

25

5

10

15

20

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.		

25

144

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

	Vacuna	Formulación/Dosis	Presentación	Volumen
5	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.
10				
15		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 secado por congelación en frascos de dos dosis.	
20				
25	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.

196

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

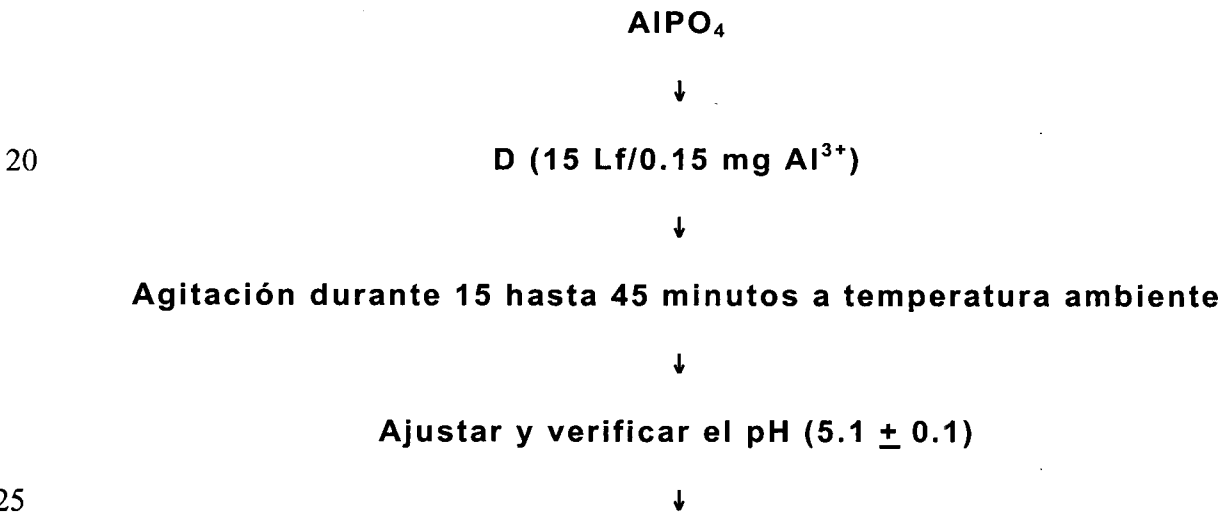
La formulación de DTPw-HBV-IPV combina el toxoide de difteria, el toxoide de tétanos, tres cepas de *Bordetella pertussis*, el antígeno superficial mayor purificado (HBsAg) del virus de Hepatitis B (HBV), y el poliovirus inactivado (IPV). Estos antígenos, excepto el

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)

↓

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

10

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.

20

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.

20 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.

25 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.

10

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

15



Agitación durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente



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



20

Agregar el PPH al recipiente de acero inoxidable estéril



Agitación durante mínimo 15 minutos a temperatura ambiente



Distribución en frascos de vidrio

25



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⁺)



HBsAg adsorbido: 10 µg

15



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 las vacunas comerciales de DTPw-HBV-IPV/Hib y de IPV.

15

- **Indicación/Poblaciones:**

Inmunización primaria de bebés sanos en la primera semana de vida contra las enfermedades de difteria, tétanos, tosferina, Hepatitis B, poliomielitis, y *Haemophilus 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

20

25

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

157

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 µg

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. Una vacuna de poliovirus inactivado, 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.

2. Una vacuna de poliovirus inactivado, la cual comprende el 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.

3. La vacuna de la reivindicación 1 ó 2, en donde el poliovirus inactivado tipo 1 está presente 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. La vacuna de la reivindicación 1 ó 2, en donde el poliovirus inactivado tipo 1 está presente 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. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 4, la cual 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. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 4, la cual 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, de alrededor o exactamente 14 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros.

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

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

9. Una vacuna de poliovirus inactivado, la cual comprende el 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, de alrededor o exactamente 14 unidades de antígeno D.

10. Una vacuna de poliovirus inactivado, la cual comprende el poliovirus inactivado 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, de alrededor o exactamente 14 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros.

5 11. La vacuna de la reivindicación 9 ó 10, la cual 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, de alrededor o exactamente 15 unidades de antígeno D.

10 12. La vacuna de la reivindicación 9 ó 10, la cual comprende adicionalmente el poliovirus inactivado tipo 1 en una 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, de
15 alrededor o exactamente 15 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros.

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

20 14. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 12, la cual comprende adicionalmente el poliovirus inactivado tipo 2 en una cantidad de 2 a 4 unidades de antígeno D por 0.5 mililitros.

25 15. La vacuna de la reivindicación 13 ó 14, en donde el poliovirus inactivado tipo 2 está presente en una dosis mayor de 2 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.

16. La vacuna de la reivindicación 13 ó 14, en donde el poliovirus inactivado tipo 2 está presente 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.

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

18. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el valor de potencia relativa es de cuando menos 0.85, 0.9, 0.95, ó 1, cuando se compara con una vacuna que comprende 8 unidades de antígeno D del poliovirus inactivado tipo 2.

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

20. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 19, la cual comprende adicionalmente el toxoide de difteria, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

21. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 20, la cual comprende adicionalmente el toxoide de tétanos, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

22. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 21, la cual comprende adicionalmente *Bordetella pertussis* de células enteras muertas, sustancialmente libre de tiomersal, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

23. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 21, la cual comprende adicionalmente dos o más componentes de tosferina acelulares (Pa) (por ejemplo, toxoide de tosferina (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), y pertactina (PRN)), opcionalmente adsorbidos sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

24. Una vacuna de DTP, la cual está sustancialmente libre de tiomersal, y la cual comprende uno o más componentes de poliovirus inactivado 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.

25. La vacuna de la reivindicación 24, la cual comprende el 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.

26. La vacuna de la reivindicación 24 ó 25, la cual comprende el 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.

27. La vacuna de las reivindicaciones 24 a 26, la cual comprende el 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.

28. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 27, la cual comprende el poliovirus inactivado tipo 1 adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

29. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 28, la cual comprende el poliovirus inactivado tipo 2 adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de

ambos.

30. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 29, la cual comprende el poliovirus inactivado tipo 3 adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de
5 ambos.

31. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 30, la cual comprende los poliovirus inactivados tipos 1, 2, y 3, adsorbidos sobre una sal de aluminio.

32. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 31, la cual
10 comprende los poliovirus inactivados tipos 1, 2, y 3, adsorbidos sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

33. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 32, la cual comprende el toxoide de difteria opcionalmente adsorbido sobre
15 hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

34. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 33, la cual comprende el toxoide de tétanos opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla
20 de ambos.

35. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 34, la cual comprende *Bordetella pertussis* de células enteras muertas, o dos o más componentes de tosferina acelulares (Pa) (por ejemplo, PT, FHA, y PRN), opcionalmente adsorbidos sobre fosfato de aluminio.

25 36. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 35, la cual

comprende adicionalmente el antígeno superficial de Hepatitis B, sustancialmente libre de tiomersal, opcionalmente adsorbido sobre fosfato de aluminio.

5 37. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 36, la cual comprende adicionalmente 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.

10 38. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 37, la cual comprende adicionalmente 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 adsorbidos sobre hidróxido de
15 aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos, o no adsorbido sobre un adyuvante.

20 39. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 38, la cual comprende adicionalmente una vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis* tipo B (MenB) o lipo-oligosacárido o un sacárido capsular MenB conjugado, o un derivado de los mismos, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos, o no adsorbido sobre un adyuvante.

25 40. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 39, la cual comprende adicionalmente un sacárido Vi 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.

5 41. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 40, la cual comprende adicionalmente un antígeno de Hepatitis A, opcionalmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio o sobre fosfato de aluminio o sobre una mezcla de ambos.

10 42. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 41, la cual comprende DT que está presente en una cantidad de 5 a 50 Lf, de 7 a 30 Lf, o de aproximadamente o exactamente 7.5 Lf ó 25 Lf por dosis de 0.5 mililitros.

15 43. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 41, la cual comprende DT que está presente en una cantidad menor de 5 Lf, o de 1 a 4 Lf, o de aproximadamente o exactamente 2 Lf por dosis de 0.5 mililitros.

20 44. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 43, la cual comprende TT que está presente en una cantidad de 2.5 a 30 Lf, de 3 a 20 Lf, de 5 a 15 Lf, o de exactamente o aproximadamente 10 Lf por dosis de 0.5 mililitros.

25 45. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 44, la cual comprende Pa que comprende PT en una cantidad de 2 a 50 microgramos, de 5 a 40 microgramos, de 10 a 30 microgramos, o de exactamente o aproximadamente 25 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

46. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 45, la cual

167

comprende Pa que comprende PT en una cantidad de exactamente o aproximadamente 2.5 u 8 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

47. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 46, la cual comprende Pa que comprende FHA en una cantidad de 2 a 50
5 microgramos, de 5 a 40 microgramos, de 10 a 30 microgramos, o de exactamente o aproximadamente 25 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

48. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 47, la cual comprende Pa que comprende FHA en una cantidad de exactamente
10 o aproximadamente 2.5 u 8 microgramos por dosis de 0.5 mililitros.

49. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 48, la cual comprende 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
15 mililitros.

50. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 49, la cual comprende Pa que comprende PRN en una cantidad de exactamente o alrededor de 0.8 ó 2.5 microgramos por 0.5 mililitros.

51. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 44, la cual
20 comprende Pw que está presente 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 de alrededor o exactamente 20 IOU por dosis de 0.5 mililitros.

52. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 51, la cual
25 comprende HB que está presente en una cantidad de 5 a 20

microgramos, de 8 a 15 microgramos, o de aproximadamente o exactamente 10 microgramos por 0.5 mililitros.

53. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 52, la cual comprende Hib que está presente en una cantidad de 5 a 20
5 microgramos, de 8 a 15 microgramos, o de aproximadamente o exactamente 10 microgramos de sacárido por dosis de 0.5 mililitros.

54. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 52, la cual comprende Hib que está presente en una cantidad de 1 a 6
10 microgramos, de 2 a 4 microgramos, o de alrededor o exactamente 2.5 microgramos de sacárido por dosis de 0.5 mililitros.

55. La vacuna de las reivindicaciones 1 a 54, la cual comprende adicionalmente 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
15 o zinc, una suspensión insoluble de tirosina acilada o de azúcares acilados, sacáridos catiónicamente o aniónicamente derivados, polifosfazenos, microesferas biodegradables, monofosforil-lípido A (MPL), derivados de lípido A de una toxicidad reducida, MPL 3-O-desacilado, quil A, Saponina, QS21, tocól, AS-2, oligonucleótidos
20 CpG, bioadhesivos, mucoadhesivos, micropartículas, liposomas, formulaciones de éter de polioxietileno, formulaciones de éster de polioxietileno, péptidos de muramilo, compuestos de imidazo-quinolona, interleucinas, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor
25 estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF).

56. La vacuna de la reivindicación 55, en donde el adyuvante es un inductor de TH1 preferencial.

57. Una vacuna que comprende una jeringa que contiene una dosis de la vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 56.

5 58. Una vacuna que comprende un frasco que contiene 1 ó 2 dosis de la vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 56.

59. Un método para la elaboración de la vacuna de las reivindicaciones 1 a 58, el cual comprende el paso de mezclar el poliovirus inactivado con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 60. Un método para prevenir o tratar una infección por poliovirus y opcionalmente una infección por *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria*, y/o *Bordetella pertussis*, mediante la administración de la vacuna de las reivindicaciones 1 a 58 a un ser humano que lo necesite.

15 61. Un método para prevenir o tratar una infección por poliovirus y opcionalmente una infección por *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria*, y/o *Bordetella pertussis*, mediante la administración de la vacuna de las reivindicaciones 1 a 58 a un ser humano que lo necesite, en un programa de inmunización primaria en
20 el primer año de vida.

62. Un método para prevenir o tratar una infección por poliovirus, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria*, y *Bordetella pertussis*, y opcionalmente una o más de infección por Hepatitis B, *Haemophilus influenzae* b, *Neisseria meningitidis* tipo A,
25 *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W,

Neisseria meningitidis tipo Y, *Neisseria meningitidis* tipo B, *Salmonella typhi*, y Hepatitis A, mediante la administración de la vacuna de las reivindicaciones 24 a 58.

5 63. El uso de la vacuna de las reivindicaciones 1 a 58, en la fabricación de un medicamento para la prevención de una enfermedad causada por poliovirus y opcionalmente *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria*, y/o *Bordetella pertussis*.

10 64. El uso de la vacuna de las reivindicaciones 24 a 58, en la fabricación de un medicamento para la prevención de una enfermedad causada por poliovirus, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria*, y *Bordetella pertussis*, y opcionalmente por una o más de Hepatitis B, *Haemophilus influenzae b*, *Neisseria meningitidis* tipo A, *Neisseria meningitidis* tipo C, *Neisseria meningitidis* tipo W, *Neisseria meningitidis* tipo Y, *Neisseria*
15 *meningitidis* tipo B, *Salmonella typhi*, y Hepatitis A.

20 65. El uso de una vacuna que comprende del 25 al 50 por ciento de la dosis estándar del poliovirus inactivado, en la fabricación de un medicamento para la prevención de polio, en donde la vacuna alcanza un valor de potencia relativa de cuando menos 0.85, 0.9, 0.95, ó 1.

66. El uso de la reivindicación 65, en donde la vacuna está de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 58.

67. Un kit que comprende primero, segundo, y opcionalmente un tercer recipiente, en donde:

25 a) el primer recipiente comprende:

1. la vacuna de poliovirus inactivado de las reivindicaciones 1 a 58;

2. el toxoide de difteria de las reivindicaciones 20 a 58;

5 3. el toxoide de tétanos de las reivindicaciones 21 a 58;

4. la *Bordetella pertussis* de células enteras muertas (Pw) de las reivindicaciones 22 a 58, o los componentes de tosferina acelulares (Pa) de las reivindicaciones 23 a 58;

10 5. opcionalmente el antígeno superficial de Hepatitis B de las reivindicaciones 36 a 58;

6. opcionalmente el conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo B de las reivindicaciones 37 a 58;

15 b) el segundo recipiente comprende:

1. opcionalmente el antígeno superficial de Hepatitis B de las reivindicaciones 36 a 58;

20 2. opcionalmente el conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo B de las reivindicaciones 37 a 58;

3. opcionalmente el uno o más de los conjugados MenA, MenC, MenW, o MenY de las reivindicaciones 38 a 58;

25 4. opcionalmente la vesícula de membrana externa de MenB, o el lipo-oligosacárido, o el conjugado de sacárido

capsular MenB de las reivindicaciones 39 a 58;

5. opcionalmente el conjugado Vi de *Salmonella typhi* de las reivindicaciones 40 a 58;

6. opcionalmente el antígeno de Hepatitis A de las reivindicaciones 41 a 58;

c) el tercer recipiente opcional comprende:

1. opcionalmente el antígeno superficial de Hepatitis B de las reivindicaciones 36 a 58;

2. opcionalmente el conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo B de las reivindicaciones 37 a 58;

3. opcionalmente el uno o más de los conjugados MenA, MenC, MenW, o MenY de las reivindicaciones 38 a 58;

4. opcionalmente la vesícula de membrana externa de MenB, o el lipo-oligosacárido, o el conjugado de sacárido capsular MenB de las reivindicaciones 39 a 58;

5. opcionalmente el conjugado Vi de *Salmonella typhi* de las reivindicaciones 40 a 58;

6. opcionalmente el antígeno de Hepatitis A de las reivindicaciones 41 a 58.

68. El kit de la reivindicación 67, en donde el antígeno superficial de Hepatitis B está presente en el primer recipiente.

69. El kit de la reivindicación 67, en donde el antígeno superficial de Hepatitis B está presente en el segundo recipiente.

70. El kit de la reivindicación 67, en donde el antígeno superficial de Hepatitis B está presente en el tercer recipiente.

71. El kit de las reivindicaciones 67 a 70, en donde está presente un conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo B en el primer recipiente.

72. El kit de las reivindicaciones 67 a 70, en donde está presente un conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo B en el segundo recipiente.

73. El kit de las reivindicaciones 67 a 70, en donde está presente un conjugado de una proteína portadora y el sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo B en el tercer recipiente.

74. El kit de las reivindicaciones 67 a 73, en donde están presentes uno o más conjugados de MenA, MenC, MenW, o MenY en el segundo recipiente.

75. El kit de las reivindicaciones 67 a 73, en donde están presentes uno o más conjugados de MenA, MenC, MenW, o MenY en el tercer recipiente.

76. El kit de las reivindicaciones 67 a 75, en donde está presente la vesícula de membrana externa de MenB, o el lipo-oligosacárido, o el conjugado de MenB, en el segundo recipiente.

77. El kit de las reivindicaciones 67 a 75, en donde está presente la vesícula de membrana externa de MenB, o el lipo-oligosacárido, o el conjugado de MenB, en el tercer recipiente.

78. El kit de las reivindicaciones 67 a 77, en donde está presente el conjugado Vi de *Salmonella typhi* en el segundo

recipiente.

79. El kit de las reivindicaciones 67 a 77, en donde está presente el conjugado Vi de *Salmonella typhi* en el tercer recipiente.

5 80. El kit de las reivindicaciones 67 a 79, en donde está presente el antígeno de Hepatitis A en el segundo recipiente.

81. El kit de las reivindicaciones 67 a 79, en donde está presente el antígeno de Hepatitis A en el tercer recipiente.

82. El kit de las reivindicaciones 67 a 81, provisto con una lista de instrucciones para la administración de las vacunas.

10 83. El uso del kit de las reivindicaciones 67 a 82, en la fabricación de un medicamento para la prevención de polio.

84. Un método de administración del kit de las reivindicaciones 67 a 82, en donde se administran las vacunas de todos los recipientes de una manera concomitante en la misma cita
15 con el practicante médico.

85. La vacuna, el método, el uso, o el kit de las reivindicaciones 1 a 84, en donde el poliovirus inactivado tipo 1, si está presente, es a partir de la cepa Mahoney.

20 86. La vacuna, el método, el uso, o el kit de las reivindicaciones 1 a 85, en donde el poliovirus inactivado tipo 2, si está presente, es a partir de la cepa MEF-1.

87. La vacuna, el método, el uso, o el kit de las reivindicaciones 1 a 86, en donde el poliovirus inactivado tipo 3, si está presente, es a partir de la cepa Saukett.

178

Potencia relativa (en comparación con la vacuna de referencia Poliorix)

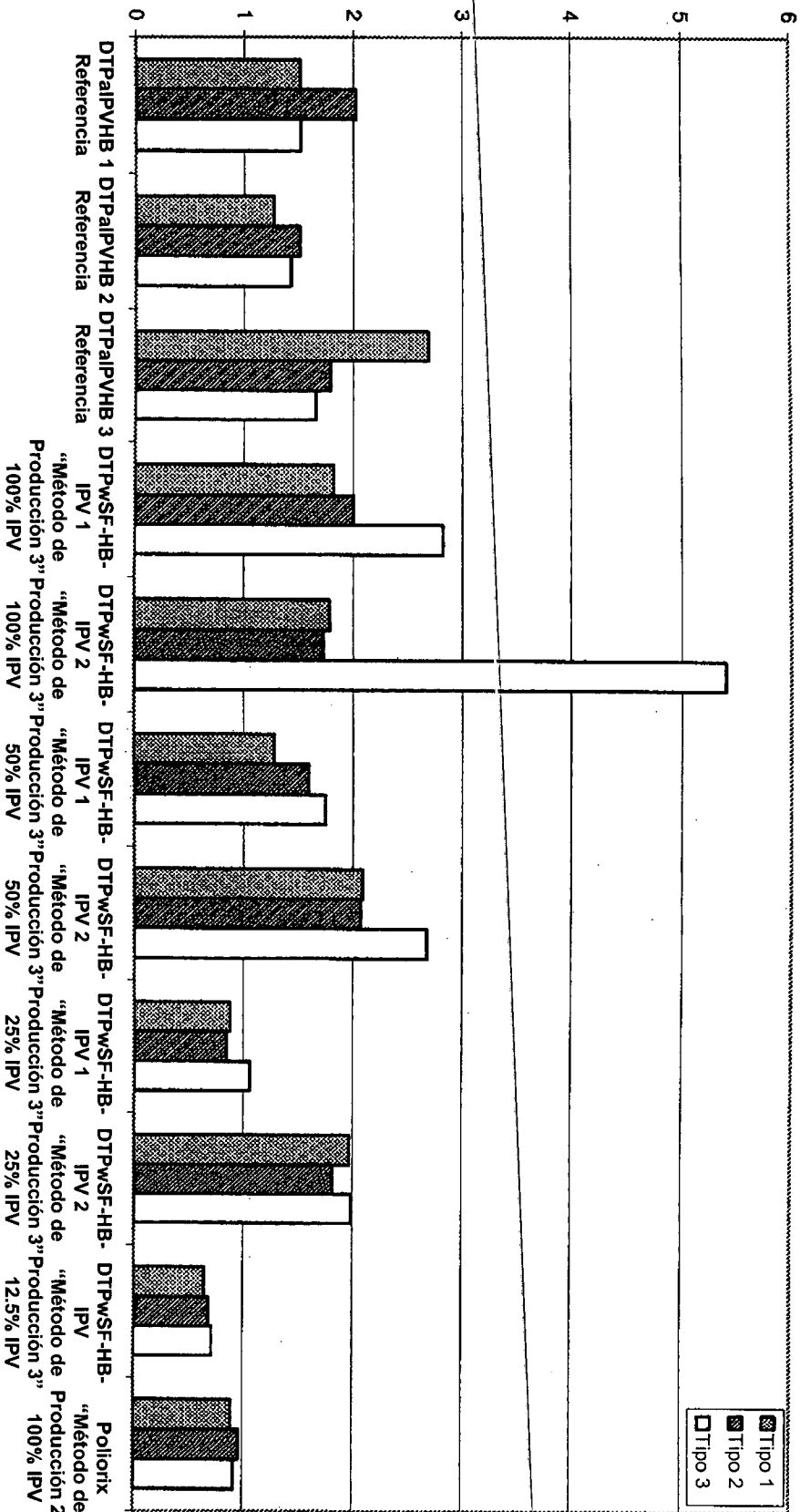


FIG. 1

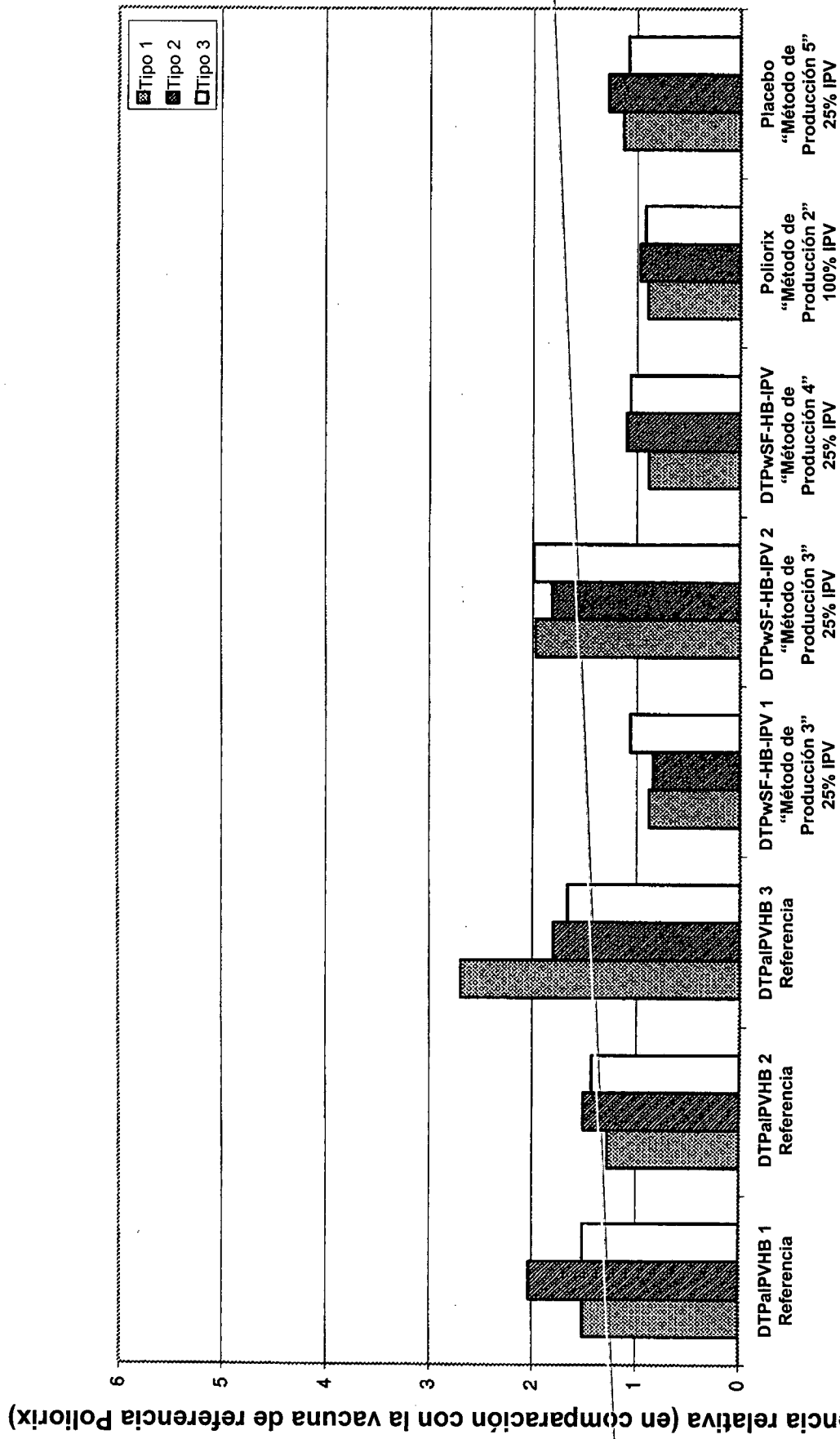


FIG. 2

177

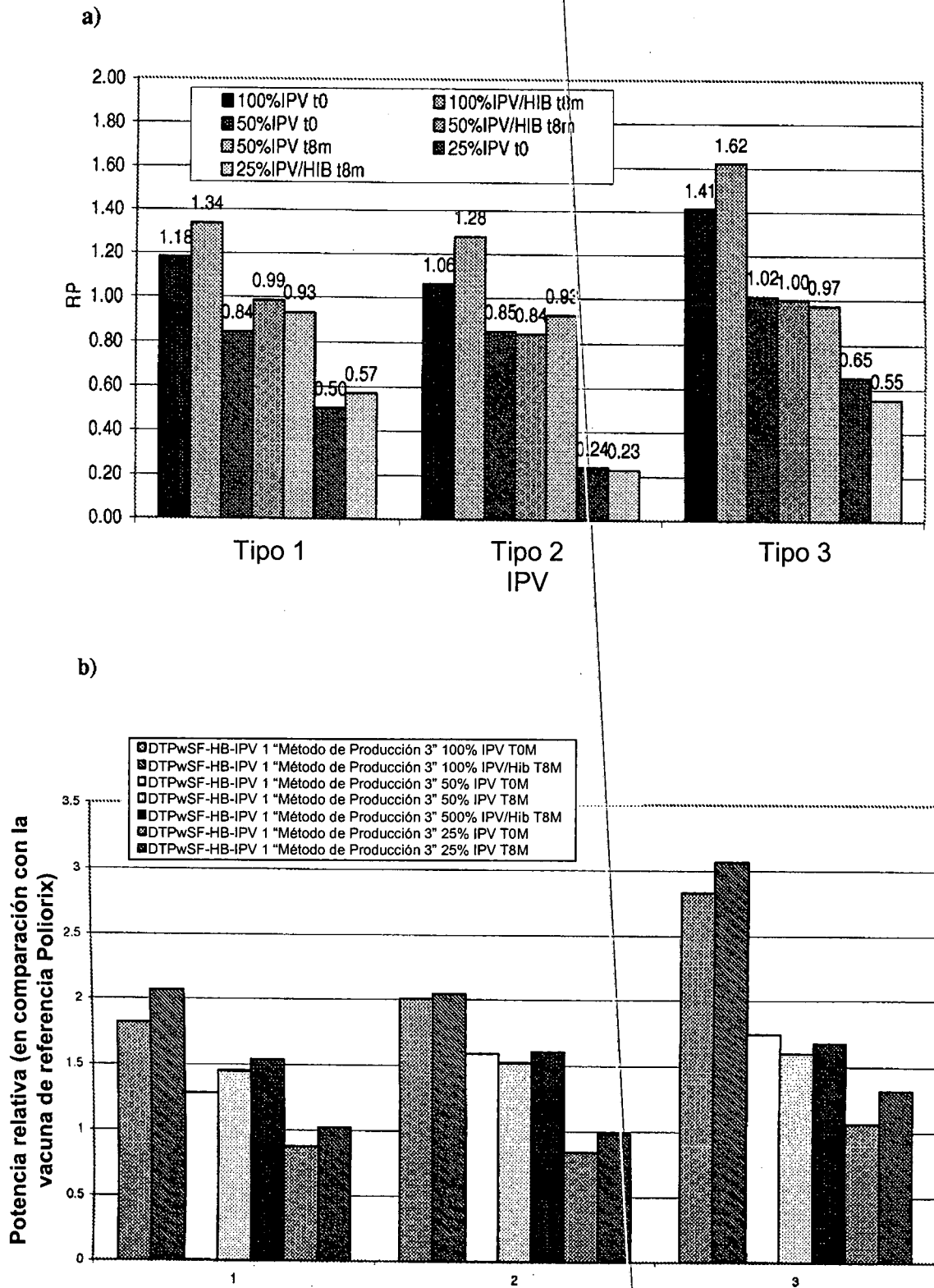


FIG. 3

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 10
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 10
- ◆ Descripción de la invención [x] 090
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 176
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 20

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

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

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

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

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fer'

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-023296- -00000-0000

Fecha: 2009-03-06 15:43:44

Tra. 11 PATENTE IYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACION

Eve: 379 FASE NACIONAL II

Folios: 178

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

REFERENCIA	Radicación No.	09 23296
	Solicitud internacional	PCT/EP2007/059390
	Fecha inicio fase nacional	07/04/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	

Nº 4 4 3 3

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. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

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 Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.:9 23296



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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha _____ 17 ABR. 2009
adpall

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

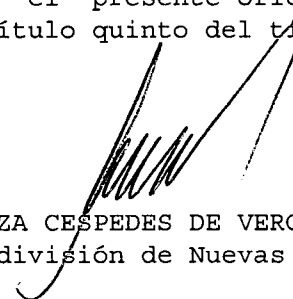
Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

REFERENCIA	Radicación No.	09 23296
	Solicitud internacional	PCI/EP2007/059390
	Fecha inicio fase nacional	07/04/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 4434

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única 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 _____
jfernand 17 ABR. 2009