



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 523**

51 Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03758486 .9**
96 Fecha de presentación : **02.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1549338**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54 Título: **Vacunas polipeptídicas que ofrecen amplia protección contra linajes de meningococos hipervirulentos.**

30 Prioridad: **11.10.2002 GB 0223741**
13.03.2003 GB 0305831
22.04.2003 GB 0309115

73 Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
Via Fiorentina 1
53100 Siena, SI, IT

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.04.2011

72 Inventor/es: **Pizza, Mariagrazia**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.04.2011

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 523 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacunas polipeptídicas que ofrecen amplia protección contra linajes de meningococos hipervirulentos.

5 **Campo técnico**

La presente invención está en los campos de inmunología y vacunología. En particular, se refiere a antígenos de *Neisseria meningitidis* (meningococo) y su uso en inmunización.

10 **Técnica anterior**

15 *N. meningitidis* es un patógeno humano gramnegativo y no móvil que coloniza la faringe y produce meningitis (y, en ocasiones, septicemia en ausencia de meningitis). Produce enfermedad tanto endémica como epidémica. Tras la introducción de la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae*, *N. meningitidis* es la principal causa de meningitis bacteriana en EE.UU.

Basándose en el polisacárido capsular del organismo se han identificado varios serogrupos de *N. meningitidis*. El serogrupo A es el patógeno implicado con mayor frecuencia en la enfermedad epidémica en el África subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la gran mayoría de los casos en EE.UU. y en la mayoría de los países desarrollados. Los serogrupos W135 e Y son responsables del resto de los casos en EE.UU. y en los países desarrollados. Después del serogrupo, la clasificación incluye el serotipo, el serosubtipo y, después, el inmunotipo, y la nomenclatura estándar enumera serogrupo, serotipo, serosubtipo e inmunotipo, cada uno separado por dos puntos, por ejemplo B:4:P1.15:L3,7,9. Dentro del serogrupo B, algunos linajes producen enfermedad a menudo (hiperinvasiva), algunos linajes producen formas más graves de la enfermedad que otros (hipervirulentos) y otros rara vez producen enfermedad. Se reconocen siete linajes hipervirulentos, a saber los subgrupos I, III y IV-1, el complejo ET-5, el complejo ET-37, el clúster A4 y el linaje 3. Éstos se han definido mediante electroforesis enzimática de multilocus (MLEE), pero también se ha usado el tipado de secuencias en multilocus (MLST) para clasificar los meningococos [ref. 1].

30 Durante muchos años se ha conocido una vacuna polisacárida contra los serogrupos A, C, W135 e Y [2, 3], pero no se ha podido preparar una vacuna contra el serogrupo B. Se han probado vacunas basadas en vesículas de membrana externa [p. ej., véase la ref. 4], pero la protección conferida por estas vacunas normalmente está restringida a la cepa usada para fabricar la vacuna. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de una vacuna contra el serogrupo B ampliamente eficaz.

35 Se han notificado las secuencias genómicas de los serogrupos de meningococos A [5] y B [6, 7] y se ha estudiado la secuencia del serogrupo B para identificar los antígenos vacunales [p. ej., ref. 8 a 13]. Los antígenos candidatos se han manipulado para mejorar la expresión heteróloga [ref. 14 a 16].

40 La referencia 16 divulga una secuencia proteica híbrida 736-AG741 (SEC ID N° 15 en la presente memoria descriptiva) para la expresión simultánea de dos o más proteínas de *Neisseria*. Esta secuencia se reivindica a partir de la reivindicación 2 parte (iii).

45 Es un objeto de la invención proporcionar más y mejores composiciones para conferir inmunidad contra la enfermedad y/o infección meningocócicas, y, en particular, para conferir amplia inmunidad contra el meningococo de serogrupo B.

Divulgación de la invención

50 Las vacunas contra patógenos tales como el virus de la hepatitis B, difteria y tétanos normalmente contienen un único antígeno proteico (p. ej., el antígeno de superficie del VHB o el toxoide del tétanos). En contraste con esto, las vacunas a celulares contra la tos ferina contienen al menos tres proteínas de *B. pertussis* y la vacuna neumocócica Prevenar™ contiene siete antígenos sacáridos conjugados distintos. Otras vacunas tales como las vacunas celulares contra pertussis, la vacuna contra el sarampión, la vacuna de la polio con virus inactivados (IPV) y las vacunas OMV meningocócicas son, por su propia naturaleza, mezclas complejas de un gran número de antígenos.

55 Por tanto, si la protección puede ser provocada por un único antígeno, un número pequeño de antígenos definidos o una mezcla compleja de antígenos indefinidos depende del patógeno en cuestión. La invención se basa en el descubrimiento de que un número pequeño de antígenos definidos es capaz de conferir amplia protección contra la infección por meningococos y la invención proporciona una composición que, después de su administración a un sujeto, es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en dicho sujeto, en el que la respuesta de anticuerpos es bactericida contra dos o más (p. ej., 2 ó 3) linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 del serogrupo B de *N. meningitidis*.

60 En lugar de consistir en un único antígeno, se prefiere que la composición comprenda una mezcla de 10 o menos (p. ej., 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) antígenos purificados y, particularmente, se prefiere que la composición no incluya mezclas complejas o indefinidas de antígenos, por ejemplo se prefiere que no incluya vesículas de la membrana externa en la composición.

ES 2 356 523 T3

Para el meningococo del serogrupo B, se ha encontrado que una mezcla de cinco antígenos proteicos definidos provoca una buena respuesta inmunitaria protectora. Por tanto, la invención proporciona una composición que comprende los siguientes cinco antígenos proteicos meningocócicos; (1) una proteína “NadA”; (2) una proteína “741”; (3) una proteína “936”; (4) una proteína “953” y (5) una proteína “287” tal como se define en las reivindicaciones. Estos antígenos se denominan en la presente memoria descriptiva los “cinco antígenos básicos”.

Proteína NadA

La proteína “NadA” (adhesina A de Neisseria) del serogrupo B de *N. meningitidis* se divulga como proteína “961” en la referencia 10 (SEC ID 2943 y 2944) y como “NMB1994” en la referencia 6 (véase también los números de acceso en GenBank: 11352904 & 7227256). Una descripción detallada de la proteína se puede encontrar en la referencia 17. No existe la proteína correspondiente en el serogrupo A [5, 17].

Cuando se usa, la NadA puede tomar varias formas. Formas preferidas de NadA son variantes truncadas o con deleciones, tales como las divulgadas en las referencias 14 a 16. En particular, se prefiere la NadA sin su anclaje a la membrana por el extremo C (p. ej., deleción de los residuos 351-405 para la cepa 2966 [SEC ID 1]) que, en ocasiones, se distingue en la presente memoria descriptiva mediante el uso de una “C” en superíndice, por ejemplo NadA^(C). La expresión de NadA sin su dominio de anclaje a la membrana (p. ej., SEC ID 1) en *E. coli* tiene como resultado la secreción de la proteína en el sobrenadante del cultivo con la eliminación concomitante de su péptido líder 23mer (p. ej., para dejar un 327mer para la cepa 2996 [SEC ID 2]). En la presente memoria descriptiva en ocasiones los polipéptidos sin sus péptidos líder se distinguen mediante el uso de un “NL” en superíndice, p. ej., NadA^(NL) o NadA^{(C)(NL)}.

Las secuencias de NadA preferidas tienen una identidad del 50% o mayor (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con la SEC ID 2. Esto incluye variantes de NadA (p. ej., variantes alélicas, homólogos, ortólogos, mutantes etc.). Formas alélicas de NadA se muestran en la Figura 9 de la referencia 18.

Otras secuencias de NadA preferidas comprenden al menos *n* aminoácidos consecutivos de la SEC ID 1, en la que *n* es 7 o más (p. ej., 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos comprenden un epítipo de NadA. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o del extremo N de la SEC ID 1 (p. ej., NadA^(C), NadA^(NL), NadA^{(C)(NL)}). Cuando se delecionan los residuos del N terminal, se prefiere que la deleción no elimine la capacidad de la NadA para adherirse a células epiteliales humanas. Un fragmento preferido de la SEC ID es la SEC ID 2.

La NadA secretada puede prepararse de forma conveniente en forma altamente pura a partir del sobrenadante del cultivo mediante un procedimiento que comprende las etapas de: Concentración y diafiltración contra un tampón mediante ultrafiltración; cromatografía en columna aniónica; cromatografía en columna hidrofóbica; cromatografía en columna cerámica de hidroxilapatita; diafiltración contra un tampón; y esterilización con filtro. Detalles adicionales del procedimiento se proporcionan en los ejemplos.

La NadA se usa, preferentemente, en forma oligomérica (p. ej., en forma trimérica).

Proteína 741

La proteína “741” del serogrupo B se divulga en la referencia 10 (SEC ID 2535 y 2536) y como “NMB1870” en la referencia 6 (véase también el número de acceso en GenBank GI:7227128). La proteína correspondiente en el serogrupo A [5] tiene un número de acceso en GenBank 7379322. La 741 es en su forma natural una lipoproteína.

Cuando se usa, la proteína 741 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de 741 variantes truncadas o con deleciones, tales como las divulgadas en las referencias 14 a 16. En particular, se puede deleccionar el extremo N de la 741 hasta, e incluida, su secuencia de poli-glicina (es decir, deleción de residuos 1 a 72 para la cepa MC58 [SEC ID 3]), que, en ocasiones, se distingue en la presente memoria descriptiva mediante el uso de un prefijo “ΔG”. Esta deleción puede potenciar la expresión. La deleción también elimina el sitio de lipidación de la 741.

Las secuencias de 741 preferidas tienen una identidad del 50% o mayor (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con la SEC ID 3. Esto incluye variantes de 741 (p. ej., variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes etc.). Las formas alélicas se pueden encontrar en las SEC ID 1 a 22 de la referencia 16 y en las SEC ID 1 a 23 de la referencia 19, las SEC ID 1-299 de la referencia 20 se proporcionan otras secuencias de 741.

Otras secuencias de 741 preferidas comprenden al menos *n* aminoácidos consecutivos de la SEC ID 3, en la que *n* es 7 o más (p. ej., 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos comprenden un epítipo de 741. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o el extremo N de la SEC ID 3.

La proteína 741 es un antígeno extremadamente eficaz para provocar respuestas de anticuerpos anti-meningococo y se expresa en todos los serogrupos de meningococos. El análisis filogenético muestra que la proteína se divide en dos grupos y que uno de estos se divide de nuevo para dar tres variantes en total [21] y, aunque el suero producido contra una variante dada es bactericida dentro del mismo grupo variante, no es activo contra cepas que expresan una

ES 2 356 523 T3

de las otras dos variantes, *es decir* existe una protección cruzada dentro de la variante pero no hay una protección cruzada entre variantes. Para una máxima eficacia cruzada entre cepas se prefiere que una composición incluya más de una variante de la proteína 741. Una secuencia de ejemplo de cada variante se proporciona en las SEC ID 10, 11 y 12 en la presente memoria descriptiva, comenzando con un residuo de cisteína en el extremo N al que se unirá de forma covalente un lípido en la forma de lipoproteína de 741.

Por tanto, se prefiere que la composición incluya al menos dos de:

(1) una primera proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un $a\%$ de identidad de secuencia con la SEC ID 10 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos x aminoácidos contiguos de la SEC ID 10; (2) una segunda proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un $b\%$ de identidad de secuencia con la SEC ID 11 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos y aminoácidos contiguos de la SEC ID 11; y (3) una tercera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un $c\%$ de identidad de secuencia con la SEC ID 12 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos z aminoácidos contiguos de la SEC ID 12. El valor de a es al menos 85, *por ejemplo* 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. El valor de b es al menos 85, *por ejemplo* 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. El valor de c es al menos 85, *por ejemplo* 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. Los valores de a , b y c no están intrínsecamente relacionados entre sí.

El valor de x es al menos 7, *por ejemplo* 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). El valor de y es al menos 7, *por ejemplo* 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250. El valor de z es al menos 7, *por ejemplo* 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). Los valores de x , y y z no están intrínsecamente relacionados entre sí.

Se prefiere que cualquier secuencia de aminoácidos de 741 no entre dentro de más de una de las categorías (1), (2) y (3). Por tanto, cualquier secuencia de 741 entrará en sólo una de las categorías (1), (2) y (3). Por tanto, se prefiere que: la proteína (1) tenga menos que un $i\%$ de identidad de secuencia con la proteína (2); la proteína (1) tenga menos que un $j\%$ de identidad de secuencia con la proteína (3); y que la proteína (2) tenga menos que un $k\%$ de identidad de secuencia con la proteína (3).

El valor de i es 60 o más (*p. ej.*, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, *etc.*) y es, como máximo, a . El valor de j es 60 o más (*p. ej.* 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, *etc.*) y es, como máximo, b . El valor de k es 60 o más (*p. ej.* 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, *etc.*) y es, como máximo, c . Los valores de i , j y k no están relacionados intrínsecamente entre sí.

40 Proteína 936

La proteína “936” del serogrupo B se divulga en la referencia 10 (SEC ID 2883 y 2884) y como “NMB2091” en la referencia 6 (véase también el número de acceso en GenBank). 7227353). El correspondiente gen en el serogrupo A [5] tiene un número de acceso en GenBank 7379093.

Cuando se usa, la proteína 936 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de 936 son variantes truncadas o con deleciones, tales como las divulgadas en las referencias 14 a 16. En particular, se puede deleccionar el péptido líder del extremo N de 936 (*es decir*, deleción de los residuos 1 a 23 para la cepa MC58 [SEC ID 4]), para dar 936^(NL).

Las secuencias de 936 preferidas tienen una identidad del 50% o mayor (*p. ej.*, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con la SEC ID 4. Esto incluye variantes de 741 (*p. ej.*, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes *etc.*).

Otras secuencias de 936 preferidas comprenden al menos n aminoácidos consecutivos de la SEC ID 4, en la que n es 7 o más (*p. ej.*, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos comprenden un epítipo de 936. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (*p. ej.*, 1, 2, 4, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o el extremo N de la SEC ID 4.

60 Proteína 953

La proteína “953” del serogrupo B se divulga en la referencia 10 (SEC ID 2917 y 2918) y como “NMB1030” en la referencia 6 (véase también el número de acceso en GenBank GI:7226269). La proteína correspondiente en el serogrupo A[5] tiene un número de acceso en GenBank 7380108.

Cuando se usa, la proteína 953 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de 953 son variantes truncadas o con deleciones, tales como las divulgadas en las referencias 14 a 16. En particular, se puede deleccionar el péptido líder del extremo N de 953 (*es decir*, deleción de los residuos 1 a 19 para la cepa MC58 [SEC ID 5]), para dar 953^(NL).

ES 2 356 523 T3

Las secuencias de 953 preferidas tienen una identidad del 50% o mayor (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con la SEC ID 5. Esto incluye variantes de 953 (p. ej., variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes *etc.*). Formas alélicas de 953 se muestran en la Figura 19 de la referencia 12.

5 Otras secuencias de 953 preferidas comprenden al menos n aminoácidos consecutivos de la SEC ID 5, en la que n es 7 o más (p. ej., 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos comprenden un epítipo de 953. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o el extremo N de la SEC ID 5.

10 *Proteína 287*

La proteína “287” del serogrupo B se divulga en la referencia 10 (SEC ID 3103 y 3104) y como “NMB2132” en la referencia 6 y como “GNA2132” en la referencia 13 (véase también el número de acceso en GenBank GI:7227388). La proteína correspondiente en el serogrupo A[5] tiene un número de acceso en GenBank 7379057.

15 Cuando se usa, la proteína 287 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de 287 variantes truncadas o con deleciones, tales como las divulgadas en las referencias 14 a 16. En particular, se puede deleccionar el extremo 287 hasta, e incluida, su secuencia de poli-glicina (es decir, deleción de residuos 1 a 24 para la cepa MC58 [SEC ID 6]), que, en ocasiones, se distingue en la presente memoria descriptiva mediante el uso de un prefijo “ΔG”. Esta deleción
20 puede potenciar la expresión.

Las secuencias de 287 preferidas tienen una identidad del 50% o mayor (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con la SEC ID 6. Esto incluye variantes de 287 (p. ej., variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes *etc.*). Las formas alélicas de 287 se pueden ver en las Figuras 5 y 15 de la referencia 12 y en el ejemplo 13 y
25 la figura 21 de la referencia 10 (SEC ID 3179 a 3184).

Otras secuencias de 287 preferidas comprenden al menos n aminoácidos consecutivos de la SEC ID 6, en la que n es 7 o más (p. ej., 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos comprenden un epítipo de 287. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (p. ej., 2,
30 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o el extremo N de la SEC ID 6.

Proteínas de fusión

Los cinco antígenos pueden estar presentes en la composición como cinco proteínas distintas, pero se prefiere
35 que al menos dos de los antígenos se expresen en forma de una única cadena polipeptídica (una proteína “híbrida” [ref. 14 a 16]), por ejemplo de modo que los cinco antígenos formen menos de cinco polipéptidos. Las proteínas híbridas ofrecen dos ventajas principales: En primer lugar, a una proteína que puede ser inestable o poco expresada por sí misma se le puede ayudar añadiendo una pareja híbrida adecuada que supere el problema; en segundo lugar, la fabricación comercial se simplifica, ya que sólo se necesita realizar una expresión y purificación con el fin de producir
40 dos proteínas útiles por separado.

Una proteína híbrida incluida en una composición comprende dos o más (*es decir*, 2, 3, 4 ó 5) de los cinco antígenos básicos. Se prefieren los híbridos constituidos por dos de los cinco antígenos básicos.

45 Dentro de la combinación de cinco antígenos básicos, un antígeno puede estar presente en más de una proteína híbrida y/o como una proteína no híbrida. No obstante, se prefiere que un antígeno esté presente en forma de híbrido o en forma de no híbrido, pero no como ambos, aunque puede ser útil incluir la proteína 741 tanto como antígeno híbrido como en forma de no híbrido (preferentemente lipoproteína), particularmente cuando se usa más de una variante de 741.

50 Híbridos de dos antígenos para usar en la invención comprenden: NadA y 741; NadA y 936; NadA y 953; NadA y 287; 741 y 936; 741 y 953; 741 y 287; 936 y 953; 936 y 287; 953 y 287. Los híbridos de dos antígenos preferidos comprenden: 741 y 936; 953 y 287.

Las proteínas híbridas se pueden representar con la fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que X es una secuencia de aminoácidos de uno de los cinco antígenos básicos; L es una secuencia de aminoácidos ligadora opcional;
55 A es una secuencia de aminoácidos opcional en el extremo N; B es una es una secuencia de aminoácidos opcional en el extremo C; y n es 2, 3, 4 ó 5.

Si un resto X tiene una secuencia de péptido líder en su forma salvaje, esta se puede incluir u omitir en la proteína
60 híbrida. En algunas formas de realización, los péptidos líder se deleccionarán a excepción por el del resto -X- localizado en el extremo N de la proteína híbrida, es decir el péptido líder de X_1 se conservará, pero los péptidos líder de $X_2 \dots X_n$ se omitirán. Esto es equivalente a eliminar todos los péptidos líder y usar el péptido líder de X_1 como resto -A-.

Para n casos de $[-\text{X-L-}]$, la secuencia de aminoácidos ligadora -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo,
65 cuando $n=2$ el híbrido puede ser $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, *etc.* La(s) secuencia(s) de aminoácidos ligadora(s) -L- normalmente serán cortas (p. ej., de 20 o menos aminoácidos, *es decir* 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos comprenden secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación, ligadores de poli-glicina (*es decir*, que comprenden Gly_n , donde $n=2,3,4,5$,

ES 2 356 523 T3

6, 7, 8, 9, 10 o más) y marcajes de histidinas (*es decir*, His_n, donde n= 3,4,5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de aminoácidos ligadoras serán evidentes para los expertos en la técnica. Un ligador útil es GSGGGG (SEC ID 9), formándose el dipéptido Gly-Ser a partir de un sitio de restricción de *Bam*HI, de modo que ayuda a la clonación y manipulación, y siendo el tetrapéptido (Gly)₄ un ligador de poli-glicina típico. Si X_{n+1} es una proteína ΔG y L_n es un ligador de glicina, éste puede ser equivalente a X_{n+1} no siendo una proteína ΔG y estando L_n ausente.

-A- es una secuencia de aminoácidos opcional en el extremo N. Esta normalmente será corta (*p. ej.*, de 40 o menos aminoácidos, *es decir*, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Ejemplos incluyen secuencias líder para dirigir el tráfico de proteínas o secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o purificación (*p. ej.*, marcas de histidina, *es decir* His_n, donde n= 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de aminoácidos en el extremo N adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica. Si X₁ carece de su propia metionina en el extremo N, -A- es, preferentemente, un oligopéptido (*p. ej.*, con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos) que proporciona una metionina en el extremo N.

-B- es una secuencia de aminoácidos opcional en el extremo C. Esta normalmente será corta (*p. ej.*, de 40 o menos aminoácidos, *es decir*, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Ejemplos incluyen secuencias líder para dirigir el tráfico de proteínas o secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o purificación (*p. ej.*, que comprenden marcas de histidina, *es decir* His_n, donde n= 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) o secuencias que potencian la estabilidad proteica. Otras secuencias de aminoácidos adecuadas en el extremo C serán evidentes para los expertos en la técnica.

Más preferentemente, n es 2. Dos proteínas preferidas de este tipo son: X₁ es una 936 y X₂ es una 741; X₁ es una 287 y X₂ es una 953.

Los dos proteínas híbridas particularmente preferidas de la invención son las siguientes:

n	A	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	B	[SEQ ID]
2	MA	ΔG287	GSGGGG	953 ^(NL)	-	-	7
2	M	936 ^(NL)	GSGGGG	ΔG741	-	-	8

Estas dos proteínas se usan en combinación con NadA (particularmente con la SEC ID 2). El híbrido 936-ΔG741 puede prepararse de forma conveniente en forma altamente pura a partir de la expresión en *E. coli* mediante un procedimiento que comprende las etapas de: homogeneización; centrifugación; cromatografía en columna catiónica; cromatografía en columna aniónica; cromatografía en columna hidrofóbica; diafiltración contra un tampón; y esterilización en filtro. Detalles adicionales del procedimiento se proporcionan en los ejemplos.

Secuencias

Se divulga un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID 1 a 8. También se divulgan polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID 1 a 8. Como se ha descrito con anterioridad, el grado de identidad de secuencia es, preferentemente, superior al 50% (*p. ej.*, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más).

Se proporciona un polipéptido que comprende un fragmento de una secuencia de NadA de *N. meningitidis*, en la que dicho fragmento conserva la capacidad de NadA para adherirse a células epiteliales humanas. Por tanto, se prefieren los fragmentos que conservan los aminoácidos 24-87 de NaDA de longitud completa. Los fragmentos preferidos carecen del péptido líder en el extremo N de dicha NadA y/o el dominio de anclaje a la membrana en el extremo C de dicha NaDA. La presente invención no incluye dentro de su alcance ninguno de los fragmentos de NaDA divulgados en la técnica anterior, *por ejemplo* en las referencias 6 a 18. Con referencia a la NadA de longitud completa [17], la SEC ID 1 carece del dominio de anclaje a la membrana y la SEC ID 2 carece del péptido líder.

La invención también proporciona ácido nucleico que codifica dichos polipéptidos. Además, se proporciona ácido nucleico que puede hibridar con este ácido nucleico, preferentemente en condiciones de "alta rigurosidad" (*p. ej.*, 65°C en una solución de 0,1 x SSC, 0,5% SDS).

Los polipéptidos se pueden preparar por varios medios (*p. ej.*, expresión recombinante, purificación en cultivo celular, síntesis química (al menos en parte), *etc.*) y en varias formas (*p. ej.*, nativa, de fusión, no glicosiladas, lipidadas, *etc.*). Preferentemente se preparan en forma sustancialmente pura (*es decir*, sustancialmente libre de otras proteínas de *N. meningitidis* o de células huésped.).

El ácido nucleico de acuerdo con la invención se puede preparar de muchos modos (*p. ej.*, síntesis química (al menos en parte), a partir de bibliotecas genómicas o de ADNc, a partir del propio organismo, *etc.*) y puede tomar

ES 2 356 523 T3

varias formas (*p. ej.*, monocatenario, bicatenario, vectores, sondas etc.). Preferentemente se preparan en forma sustancialmente pura (*es decir*, sustancialmente libre de otros ácidos nucleicos de *N. meningitidis* o de células huésped.).

5 El término “ácido nucleico” incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tales como los que contienen estructuras modificadas (*p. ej.*, fosforotioatos *etc.*), así como ácidos nucleicos de péptidos (PNA) *etc.* La invención incluye secuencias que comprenden ácido nucleico complementarias a las descritas con anterioridad (*p. ej.*, para fines de antisentido o de sondaje).

10 También se proporciona un procedimiento para producir un polipéptido, que comprende la etapa de cultivar una célula huésped con ácido nucleico en condiciones que inducen la expresión del polipéptido.

Cepas

15 Las proteínas preferidas comprenden una secuencia de aminoácidos que se encuentra en el serogrupo B de *N. meningitidis*. Dentro del serogrupo B, las cepas preferidas son 2996, MC58, 95N477 y 394/98. La cepa 394/98 en ocasiones se denomina, en la presente memoria descriptiva, “NZ”, ya que es una cepa de Nueva Zelanda. Preferentemente, la proteína 287 procede de la cepa 2996 o, más preferentemente, de la cepa 394/98.

20 Preferentemente, la 741 procede de las cepas del serogrupo B MC58, 2996, 394/98 o 95N477, o de la cepa del serogrupo C 90/18311. La cepa MC58 es más preferida.

Las proteínas 936, 953 y NadA proceden, preferentemente, de la cepa 2996.

25 Las cepas pueden indicarse en forma de subíndice, por ejemplo, la 741_{MC58} es la proteína 741 de la cepa MC58. A menos que se indique lo contrario, las proteínas mencionadas en la presente memoria descriptiva (*p. ej.*, sin subíndice) proceden de la cepa 2996 de *N. meningitidis*, que se puede tomar como cepa “de referencia”. No obstante, se apreciará que la invención no está, en general, limitada por la cepa. Como se ha mencionado con anterioridad, las referencias generales a una proteína (*p. ej.*, “287”, “919” *etc.* pueden tomarse de modo que incluyan la proteína de cualquier cepa. Normalmente, esta tendrá una identidad de secuencia con 2996 del 9% o más (*p. ej.*, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 30 99% o más). Cuando una composición incluye un antígeno proteico concreto (*p. ej.*, 741 o 287), la composición puede incluir dicho antígeno en más de una forma variante, por ejemplo la misma proteína, pero procedente de más de una cepa. Estas proteínas se pueden incluir en forma de proteínas en tándem o por separado.

35 Cuando se usan proteínas híbridas, los antígenos individuales dentro del híbrido (*es decir*, los restos -X- individuales) pueden proceder de una o más cepas. Cuando $n = 2$, por ejemplo, X₂ puede proceder de la misma cepa que X₁ o de una cepa diferente.

40 Cuando $n = 3$, las cepas podrían ser (i) X₁ = X₂ = X₃ (ii) X₁ = X₂ ≠ X₃ (iii) X₁ ≠ X₂ = X₃ (iv) X₁ ≠ X₂ ≠ X₃ o (v) X₁ = X₃ ≠ X₂, *etc.*

Linajes hipervirulentos y respuestas bactericidas de anticuerpos

45 En general, las composiciones de la invención pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos después de su administración a un sujeto. Estas respuestas se miden de forma conveniente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [*p. ej.*, véase la nota al final 14 de la referencia 13]. La actividad bactericida en suero (ABS) mide la muerte de bacterias mediada por el complemento y se puede analizar usando complemento humano o de cachorro de conejo. Las normas de la OMS requieren que una vacuna induzca al menos una elevación multiplicada por 4 de la ABS en más del 90% de los receptores.

50 En lugar de ofrecer una protección estrecha, las composiciones de la invención pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos contra más de un linaje hipervirulento del serogrupo B. En particular, pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos contra dos o tres de los siguientes tres linajes hipervirulentos: (i) clúster A4; (i) complejo ET-5; y (iii) linaje 3. Adicionalmente pueden inducir respuestas bactericidas de anticuerpos contra uno o más linajes hipervirulentos del subgrupo I, subgrupo III, subgrupo IV-1 o complejo ET-37, y contra otros linajes, *por ejemplo* 55 linajes hiperinvasivos.

60 Esto no significa necesariamente que la composición pueda inducir anticuerpos bactericidas contra todas u cada una de las cepas de meningococo del serogrupo B en estos linajes hipervirulentos, por ejemplo, en su lugar, para cualquier grupo dado de cuatro o más cepas del meningococo del serogrupo B en un linaje hipervirulento concreto, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas contra al menos el 50% (*p. ej.*, 60%, 70%, 80%, 90% o más) del grupo. Los grupos de cepas preferidos incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los países siguientes: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. Preferentemente, el suero tiene un título bactericida de al menos 1024 (*p. ej.*, 2¹⁰, 2¹¹, 2¹², 2¹³, 2¹⁴, 2¹⁵, 2¹⁶, 2¹⁷, 2¹⁸ o mayor, preferentemente al menos 2¹⁴), *es decir*, el suero puede matar al menos el 50% de las bacterias de ensayo de una cepa concreta cuando está diluida al 1/1024, como se describe en la 65 referencia 13.

Las composiciones preferidas pueden inducir respuestas bactericidas contra las cepas siguientes de meningococo del serogrupo B: (i) del clúster A4, cepa 961-5945 (B:2b:P1.21, 16) y/o cepa G2136 (B:-); (ii) del complejo ET-5,

ES 2 356 523 T3

cepa MC58 (B:15:P1.7,16b) y/o cepa 44/76 (B:15:P1.7,16); (iii) del linaje 3, cepa 394/98 (B:4:P1.4) y/o cepa BZ198 (B:NT:-). Las composiciones más preferidas pueden inducir respuestas bactericidas contra las cepas 961-5945, 44/76 y 394/98.

5 Las cepas 561-5945 y G2136 son las dos cepas de referencia de *Neisseria* MLST [ids 638 y 1002 en la referencia 22]. La cepa MC58 está ampliamente disponible (p. ej., ATCC BAA-335) y era la cepa que se secuenció en la referencia 6. La cepa 44/76 se ha usado ampliamente y se ha caracterizado (p. ej., ref. 23 y es una de las cepas de referencia *Neisseria* MLST [id 237 en la referencia 22; fila 32 de la Tabla 2 en la referencia 1]. Originalmente, la cepa 394/98 se aisló en Nueva Zelanda en 1998 y se han publicado varios estudios usando esta cepa (p. ej., ref. 24 y 25). La cepa BZ
10 198 es otra cepa de referencia MLST [id 409 en la referencia 22; fila 41 de la Tabla 2 en la referencia 1-].

La composición puede adicionalmente inducir una respuesta bactericida contra la cepa LNP17592 serogrupo W135 (W135:2a: P 1.5,2 del complejo ET-37. Esta es una cepa Haji aislada en Francia en el año 2000.

15 *Huésped heterólogo*

Aunque la expresión de las proteínas de la invención puede tener lugar en *Neisseria*, la presente invención utiliza, preferentemente, un huésped heterólogo. El huésped heterólogo puede ser procarionta (p. ej., una bacteria) o eucariota. Preferentemente es *E. coli*, pero otros huéspedes adecuados incluyen *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (p.ej., *M. tuberculosis*), levaduras, etc.

Por tanto, la invención proporciona una composición que, después de la administración a un sujeto, puede inducir una respuesta de anticuerpo en dicho sujeto, en el que la respuesta de anticuerpo es bactericida contra dos o más
25 (p. ej., 2 ó 3) linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 de *N. meningitidis*, serogrupo B, y en el que los inmunógenos en la composición que dan lugar a la respuesta de anticuerpo se obtienen mediante expresión recombinante en un huésped que no sea *Neisseria*. Por tanto, los inmunógenos en las composiciones de la invención son, preferentemente, inmunógenos recombinantes. En consecuencia pueden preferirse composiciones que no incluyen preparaciones OMV.

30 *Composiciones y medicamentos inmunogénicos*

Las composiciones de la invención son inmunogénicas y son, más preferentemente, composiciones vacunales. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (*es decir*, para prevenir la infección) o terapéuticas (*es decir*, para tratar la infección), pero normalmente serán profilácticas.

35 El pH de la composición está, preferentemente, entre 6 y 8, preferentemente de aproximadamente 7. El pH estable se puede mantener mediante el uso de un tampón. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón de histidina [26]. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

40 Las composiciones se pueden presentar en viales o se pueden presentar en jeringas ya cargadas. Las jeringas se pueden suministrar con o sin agujas. Una jeringa incluirá una única dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis o múltiples dosis. Normalmente, las composiciones inyectables serán soluciones o suspensiones líquidas. Como alternativa, pueden presentarse en forma sólida (p. ej., liofilizadas) para solución o suspensión en
45 vehículos líquidos antes de la inyección.

Las composiciones de la invención pueden envasarse en forma de monodosis o en forma de múltiples dosis. Para las formas de múltiples dosis se prefieren los viales a las jeringas precargadas. Se pueden establecer volúmenes de dosificación eficaces de forma rutinaria, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un
50 volumen de 0,5 ml.

Cuando una composición de la invención se puede preparar de forma extemporánea antes de usar (p. ej., cuando un componente se presenta en forma liofilizada) y se presenta en forma de kit, el kit puede comprender dos viales o
55 puede comprender una jeringa ya cargada y un vial, usándose los contenidos de la jeringa para reactivar los contenidos del vial antes de la inyección.

La invención también proporciona una composición de la invención para usar como medicamentos. Preferentemente, el medicamento es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero (*es decir*, es una composición inmunogénica) y es, más preferentemente, una vacuna.

60 La invención también proporciona el uso de una composición de la invención en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero. Preferentemente, el medicamento es una vacuna.

65 La invención también proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición de la invención. Preferentemente, la respuesta inmunitaria es protectora y, preferentemente, implica la aparición de anticuerpos. El procedimiento puede provocar una respuesta de refuerzo.

ES 2 356 523 T3

Preferentemente, el mamífero es un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es, preferentemente, un niño (p. ej., un niño pequeño o un lactante); cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es, preferentemente, un adulto. Una vacuna destinada a niños puede también administrarse a adultos, por ejemplo para evaluar la seguridad, la dosificación, la inmunogenicidad *etc.*

5

Estos usos y procedimiento son, preferentemente, para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad producida por una *Neisseria* (p. ej., meningitis, septicemia, bacteriemia, gonorrhoea *etc.*). Se prefiere la prevención y/o tratamiento de la meningitis bacteriana o meningocócica.

10

Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección por *Neisseria* tras la administración de la composición de la invención. Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar las respuestas inmunitarias contra los cinco antígenos básicos tras la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención se puede determinar mediante su administración a sujetos de ensayo (p. ej., niños de 12-16 meses de edad o modelos animales [27]) y, después, determinando los parámetros estándar, incluidos los anticuerpos bactericidas en suero (ABS) y los títulos de ELISA (GMT) de IgG total y anti-cápsula de alta avidéz. Estas respuestas inmunitarias generalmente se determinarán alrededor de meses después de la administración de la composición y se compararán con los valores determinados antes de la administración de la composición. Se prefiere un incremento de los ABS de al menos 4 u 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, se puede realizar más de una determinación postadministración.

15

Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente que es superior al criterio para seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable se sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpos asociado superior a lo que en un huésped se considera seroconversión contra al antígeno son bien conocidos y dichos títulos son publicados por organizaciones tales como la OMS. Preferentemente, más del 80% de una muestra estadísticamente significativa de sujetos está seroconvertido, más preferentemente más del 90%, todavía más preferentemente más del 93% y, más preferentemente, 96-100%.

20

En general, las composiciones de la invención se administrarán directamente a un paciente. La administración directa se puede conseguir mediante inyección parenteral (p. ej. por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido) o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra mucosa. Se prefiere la administración intramuscular en el muslo o el brazo. La inyección se puede realizar a través de una aguja (p. ej., una aguja hipodérmica) pero, como alternativa, se puede usar la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

25

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

30

La posología del tratamiento puede ser un calendario de dosis única o un calendario de múltiples dosis. Las múltiples dosis pueden usarse en un calendario de inmunización primaria y/o en un calendario de inmunización de refuerzo. A un calendario de dosis primaria le puede seguir un calendario de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre las dosis iniciales (p. ej., entre 4-16 semanas) y entre la administración inicial y la de refuerzo se pueden determinar de forma rutinaria.

35

Las infecciones con *Neisseria* afectan a varias zonas del cuerpo y, por tanto, las composiciones de la invención se pueden preparar de varias maneras. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar en forma de inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección (p. ej., una composición liofilizada). La composición se puede preparar para administración tópica, por ejemplo en forma de un ungüento, crema o polvo. La composición se puede preparar para administración oral, por ejemplo en forma de un comprimido o cápsula, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición se puede preparar para administración pulmonar, *por ejemplo* en forma de un inhalador, usando un polvo fino o un atomizador. La composición puede prepararse en forma de un supositorio o pesario. La composición se puede preparar para administración nasal, aural u ocular, *por ejemplo* en forma de atomizador, gotas, gel o polvo [p. ej., referencias 28 y 29]. Se ha notificado el éxito con la administración nasal de sacáridos neumocócicos [30,31], polipéptidos neumocócicos [32], sacáridos de Hib [33], sacáridos de MenC [34] y mezclas de conjugados sacáridos de Hib y MenC [35].

40

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno(s), así como de cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" se quiere decir que la administración de dicha cantidad a un individuo, bien en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para tratamiento o prevención. Esta cantidad varía en función de la salud y el estado físico del individuo que se va a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (p. ej., primate no humano, primate *etc.*), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico encargado del tratamiento de la situación médica y otros factores relevantes. Cabe esperar que la cantidad entrará dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios y una cantidad típica de cada antígeno sacárido meningocócico por dosis está entre 1 μg y 20 μg , *por ejemplo* aproximadamente 1 μg , aproximadamente 2,5 μg , aproximadamente 4 μg , aproximadamente 5 μg o aproximadamente 10 μg (expresados como sacárida).

45

50

55

Otros componentes no antigénicos de la composición

Normalmente, la composición de la invención comprende, además de los componentes mencionados con anterioridad, uno o más “transportadores farmacéuticamente aceptables”, que incluyen cualquier transportador que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos dañinos para los individuos que reciban la composición. Normalmente, los transportadores adecuados son macromoléculas grandes que se metabolizan despacio, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa [36], trehalosa [37], lactosa y agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas). Dichos transportadores son bien conocidos para los expertos en la técnica. Las vacunas pueden también contener diluyentes tales como agua, solución salina, glicerol, *etc.* Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH y similares. Un transportador típico es la solución salina fisiológica tamponada con fosfato estéril y sin pirógenos. En la referencia 38 se puede encontrar una exhaustiva discusión de excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones de la invención pueden incluir un antimicrobiano, particularmente envasado en formato de múltiples dosis.

Las composiciones de la invención pueden comprender detergente, *por ejemplo* un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Generalmente, los detergentes están presentes a niveles bajos, *por ejemplo* < 0,01%.

Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (*p. ej.*, cloruro sódico) para dar tonicidad. Una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl es típica.

Generalmente, las composiciones de la invención incluyen un tampón. Un tampón fosfato es típico.

Las composiciones de la invención pueden comprender un alcohol de azúcar (*p. ej.*, manitol) o un disacárido (*p. ej.*, sacarosa o trehalosa), por ejemplo a aproximadamente 15-30 mg/ml (*p. ej.*, 25 mg/ml), particularmente si se van a liofilizar o si incluyen material que se ha reconstituido a partir de material liofilizado. El pH de una composición para liofilización se puede ajustar a aproximadamente 6,1 antes de la liofilización.

Las vacunas de la invención pueden administrarse junto con otros agentes inmunoreguladores. En particular, las composiciones normalmente incluirán un adyuvante. Los adyuvantes que se pueden usar en las composiciones de la invención incluyen, entre otros:

A. Composiciones que contienen mineral

Las composiciones que contienen mineral adecuadas para usar como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (*p. ej.*, oxihidróxidos), fosfatos (*p. ej.*, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos *etc.* [*p. ej.*, véanse los capítulos 8 y 9 de la referencia 39] o mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (*p. ej.*, gel, cristalina, amorfo, *etc.*) y prefiriéndose la adsorción. Las composiciones que contienen minerales también se pueden formular en forma de una partícula de una sal metálica [40].

Particularmente se prefieren fosfatos de aluminio, particularmente en las composiciones que incluyen un antígeno sacárido de *H. influenzae* y un adyuvante típico es hidroxifosfato aluminio amorfo con una proporción molar de PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg de Al^{3+} /ml. La adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio se puede usar, por ejemplo, entre 50 y 100 μg de Al^{3+} por conjugado por dosis. Cuando hay más de un conjugado en una composición, no todas los conjugados tienen que adsorberse.

B. Emulsiones en aceite

Las composiciones en emulsión en aceite adecuadas para usar como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tal como MF59 [Capítulo 10 de la referencia 39; véase también la referencia 41] (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85, formulado en partículas de submicrones usando un microfluidizador). También se pueden usar adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de referencia 39]

Las formulaciones de saponina también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glicósidos de esteroles y glicósidos de triterpenoide que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia gama de especies de plantas. La saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como adyuvante. La saponina también se puede obtener comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (jabonera). Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM. El QS21 se comercializa como Stimulon™.

Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones específicas purificadas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente,

ES 2 356 523 T3

la saponina es QS21. En la referencia 42 se divulga un procedimiento de producción de QS21. Las formulaciones de saponina pueden también comprender un esteroles, tal como colesterol [43].

Las combinaciones de saponinas y colesteroles se pueden usar para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la referencia 39]. Normalmente, los ISCOM también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. En los ISCOM se puede usar cualquier saponina conocida. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen con mayor detalle en las referencias 43-45. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional [46].

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina se puede encontrar en las referencias 47 y 48.

D. *Virosomas y partículas similares a virus*

Los virosomas y partículas similares a virus (VLP) también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Generalmente estas estructuras contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. En general son no patogénicas, no replicantes y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse de forma recombinante o aislarse a partir de virus enteros. Estas proteínas virales adecuadas para usar en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tal como HA o NA), el virus de la hepatitis B (tal como proteínas del núcleo o de la cápside), el virus de la hepatitis E, el virus del sarampión, el virus Sindbis, rotavirus, el virus de la enfermedad pie-boca, retrovirus, virus de Norwalk, el virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como proteína pl del retrotransposón Ty). Las VLP se tratan con mayor detalle en las referencias 49-54. Los virosomas se tratan con mayor detalle en, por ejemplo, la referencia 55.

E. *Derivados de bacterias o microbianos*

Los adyuvantes adecuados para usar en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos del lipopolisacárido de enterobacterias (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas de ribosilación de ADP y derivados destoxificados de los mismos.

Los derivados no tóxicos del LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de 3 monofosforil lípido A O-desacilado con 4, 5, o 6 cadenas aciladas. Una forma en "partícula pequeña" preferida de 3 monofosforil lípido A O-desacilado se divulga en la referencia 56. Dichas "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas como para esterilizarse mediante filtración a través de una membrana de 0,22 μm [56]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen similares al monofosforil lípido A, tal como derivados de aminoalquilglucosaminida fosfato, por ejemplo RC-529 [57, 58].

Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli*, tal como OM-174. El OM-174 se describe en, por ejemplo, las referencias 59 y 60.

Oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para usar como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no metilada unida por un enlace de fosfato a una guanosina). También se ha demostrado que los ARN de doble cadena y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimuladores.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble cadena o de una cadena. Las referencias 61, 62 y 63 divulgan posibles sustituciones de análogos, por ejemplo sustitución de guanosina con 2'-desoxi-7-deazaguanosina. El efecto de adyuvante de los oligonucleótidos CpG se trata adicionalmente en las referencias 64-69.

La secuencia de CpG puede dirigirse a aTLR9, tal como el motivo GTCGTI o TTCGTT [70], La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como CpG-A ODN, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como CpG-B ODN. CpG-A y CpG-B ODN se tratan en las referencias 71-73. Preferentemente, el CpG es un CpG-A ODN.

Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente se pueden unir dos secuencias oligonucleotídicas CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las referencias 70 & 74-76.

Toxinas bacterianas de ribosilación de ADP y derivados destoxificados de las mismas se pueden usar como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas de ribosilación de ADP destoxificadas tales como adyuvantes de mucosa se describe en la referencia 77 y como adyuvantes parenterales en la referencia 78. La toxina o toxoide está, preferentemente, en forma de holotoxina, que comprende las subunidades A y B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación destoxificante; preferentemente la subunidad B no ha mutado. Preferentemente, el adyuvante es una LT mutante destoxificada tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas

de ribosilación de ADP y derivados destoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes se puede encontrar en las referencias 79-86. Preferentemente, la referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa en las alineaciones de las subunidades A y B de las toxinas de ribosilación de ADP indicadas en la referencia 87, específicamente incorporadas en la presente memoria descriptiva en su totalidad por referencia.

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos para usar como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (p. ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [88], etc.) [89], interferones (p. ej., interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

Los bioadhesivos y mucoadhesivos también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico [90] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También se pueden usar como adyuvantes en la invención quitosano y derivados del mismo [91].

H. Micropartículas

Las micropartículas también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (*es decir*, una partícula de ~100 nm a ~150 μ m de diámetro, más preferentemente de ~200 nm a ~30 μ m de diámetro, y más preferentemente de 500 nm a ~10 μ m de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (p. ej., un poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona etc.) con poli(láctido-co-glicólido), opcionalmente tratadas para tener una superficie con carga negativa (p. ej., con SDS) o una superficie con carga positiva (p. ej., con un detergente catiónico, tal como CTAB).

I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la referencia 39)

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para usar como adyuvantes se describen en las referencias 92-94.

J. Formulaciones de polioxietilenéter y polioxietilenéster

Adyuvantes adecuados para usar en la invención incluyen polioxietilenéteres y polioxietilenésteres [95]. Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de polioxietilenéster de sorbitano en combinación con un octoxinol [96] así como tensioactivos de polioxietilenéter o éster de alquilo en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [97]. Los polioxietilenéteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: Polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteroriléter, polioxietilen-8-esteoriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter y polioxietilen-23-lauriléter.

K. Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones de PCPP se describen en, por ejemplo, las referencias 98 y 99.

L. Péptidos de muramilo

Ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para usar como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramilo-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramilo-L-alanil-D-isoglutamilo-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

M. Compuestos de imidazoquinolona

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para usar adyuvantes en la invención incluyen Imiquimod y sus homólogos (p. ej., "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las referencias 100 y 101.

La composición de la invención puede también comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados con anterioridad. Por ejemplo, las siguientes composiciones adyuvantes se pueden usar en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [102]; (2) una saponina (p. ej., QS21) + un derivado de LPS no tóxico (p. ej., 3dMPL) [103]; (3) una saponina (p. ej., QS21) + un derivado de LPS no tóxico (p. ej., 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (p. ej., QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [104]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [105]; (6) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80TM, 5% de polímero de bloque-plurónico L121 y thr-MDP, bien microfluidizados en una emulsión en submicrones o agitados en vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande. (7) Sistema adyuvante RibitTM (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo constituido por monofosforilo lípi-

ES 2 356 523 T3

do A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™) y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

5 Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se divulgan en el capítulo 7 de la referencia 39.

El uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio o de fosfato de aluminio es particularmente preferido y, generalmente, los antígenos se adsorben en estas sales. Preferentemente, el hidróxido de aluminio se evita como adyuvante si la composición incluye un antígeno Hib. Cuando se usa fosfato de aluminio y no se desea que adsorba un antígeno en el adyuvante, se favorece incluyendo iones fosfato libres en solución (*p. ej.*, mediante el uso de un tampón fosfato). La prevención de la adsorción también se puede conseguir seleccionando el pH correcto durante la mezcla de antígeno/adyuvante, un adyuvante con una carga de punto de cero adecuada y un orden adecuado de mezcla de diferentes antígenos en una composición [106].

15 Otro adyuvante preferido es fosfato cálcico.

Otros antígenos

Las composiciones de la invención contienen cinco antígenos de proteínas de meningococos. También pueden incluir otros antígenos, aunque pueden no contener antígenos de proteínas meningocócicas distintos a los cinco antígenos básicos. Otros antígenos para incluir pueden ser, por ejemplo:

- un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B.
- 25 - un antígeno sacárido de *N. meningitidis*, serogrupo A, C, W135 y/o Y, tal como el oligosacárido divulgado en la referencia 107, del serogrupo C o los oligosacáridos de la referencia 108.
- un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [*p. ej.*, 155, 156 157].
- 30 - un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivados [*p. ej.*, 109, 110].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o del núcleo [*p. ej.*, 110, 111].
- un antígeno de difteria, tal como el toxoide de la difteria [*p. ej.*, capítulo 3 de la referencia 112], *por ejemplo* el mutante CRM₁₉₇ [*p. ej.*, 113].
- 35 - un antígeno del tétanos, tal como el toxoide del tétanos [*p. ej.*, capítulo 4 de la referencia 112].
- Un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina de pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [*p. ej.*, referencias 114 y 115]. También se puede usar antígeno pertussis celular.
- una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) de *N. meningitidis*, serogrupo B, tal como las descritas en las referencias 4, 116, 117, 118 *etc.*
- 45 - antígeno(s) de la polio [*p. ej.*, 119, 120] tal como OPV o, preferentemente, IPV.

La composición puede comprender uno o más de estos otros antígenos: Normalmente, los antígenos estarán presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra ese antígeno. Se prefiere que la eficacia protectora de los antígenos sacáridos individuales no se elimina al combinarlos, aunque la inmunogenicidad real (*p. ej.*, los títulos en ELISA) se puede reducir.

55 Cuando un antígeno de difteria está incluido en la composición, también se prefiere incluir los antígenos del tétanos y de pertussis. De forma similar, cuando un antígeno del tétanos está incluido, también se prefiere incluir los antígenos de difteria y de pertussis. De forma similar, cuando un antígeno de pertussis está incluido, también se prefiere incluir los antígenos de difteria y del tétanos. Tales combinaciones de DTP se pueden usar para reconstituir conjugados liofilizados.

60 Cuando se unan un antígeno sacárido o de hidrato de carbono, preferentemente se conjuga con una proteína transportadora con el fin de potenciar la inmunogenicidad (véase más adelante).

Los antígenos de proteínas tóxicas se pueden destoxificar cuando sea necesario (*p. ej.*, destoxicación de la toxina de pertussis por medios químicos y/o genéticos [115]).

65 Como alternativa al uso de antígenos proteicos en la composición se puede usar ácido nucleico que codifica el antígeno [*p. ej.*, referencias 121 a 129]. Los componentes proteicos de las composiciones pueden reemplazarse de este

ES 2 356 523 T3

modo por un ácido nucleico (preferentemente ADN, p. ej., en forma de un plásmido) que codifica la proteína. De forma similar, las composiciones de la invención pueden comprender proteínas que imitan antígenos sacáridos, por ejemplo mimotopos [130] o anticuerpos anti-idiotipo. Estos pueden reemplazar los componentes sacáridos individuales o pueden complementarlos. Como ejemplo, la vacuna puede comprender un péptido imitador del MenC [131] o el polisacárido capsular MENA [132] en lugar del propio sacárido.

Composiciones particularmente preferidas de la invención incluyen uno, dos o tres de: (a) antígenos sacáridos de los serogrupos Y, W135, C y (opcionalmente) A de meningococos; (b) un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* tipo B; y/o (c) un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*. Particularmente preferida es una composición que comprende los antígenos del serogrupo B y un conjugado Hib.

Serogrupos Y, W135, C y (opcionalmente) A de meningococo

Como se ha mencionado con anterioridad, las vacunas de polisacáridos contra los serogrupos A, C W135 e Y se han conocido durante muchos años. Estas vacunas (MENCEVAX ACWY™ y MENOMUNE™) se basan en los polisacáridos capsulares de los organismos y, aunque son eficaces en adolescentes y adultos, proporcionan una respuesta inmunitaria mala y una duración corta de la protección, y no pueden usarse en lactantes.

En contraste con los antígenos polisacáridos no conjugados en estas vacunas, las vacunas del serogrupo C recientemente aprobadas (Menjugate™ [133,107], Meningitec™ y NeisVac-C™) incluyen sacáridos conjugados. Menjugate™ y Meningitec™ tienen antígenos oligosacáridos conjugados con un transportador CRM₁₉₇, mientras que NeisVac-C™ usa el polisacárido completo (des-O-acetilado) conjugado con un transportador del toxoide del tétanos.

Las composiciones de la presente invención incluyen, preferentemente, antígenos sacáridos capsulares de uno o más de los serogrupos Y, W135, C y (opcionalmente) A de meningococos, en las que los antígenos están conjugados a proteína(s) transportadora(s) y/o son oligosacáridos.

Una cantidad típica de cada antígeno sacárido de meningococo por dosis está entre 1 µg y 20 µg, por ejemplo aproximadamente 1,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg (expresados en forma de sacárido).

Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de los serogrupos A y C, la proporción (p/p) del sacárido MenA:sacárido MenC puede ser superior a 1 (p. ej., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor). Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares del serogrupo Y y uno o ambos serogrupos C y W135, la proporción (p/p) del sacárido MenY:sacárido MenW135 puede ser superior a 1 (p. ej., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor) y/o que la proporción (p/p) del sacárido MenY:sacárido MenC puede ser inferior a 1 (p. ej., 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o menor). Las proporciones (p/p) preferidas para los sacáridos de los serogrupos A:C:W135:Y son: 1: 1:1:1; 1: 1: 1:2; 2: 1: 1: 1; 4:2: 1: 1; 8:4:2: 1; 4:2: 1:2; 8:4: 1:2; 4:2:2: 1; 2:2: 1:1; 4:4:2: 1; 2: 2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2: 1. Las proporciones (p/p) preferidas para los sacáridos de los serogrupos C:W135:Y son: 1:1:1; 1:1:2; 1:1:1; 2: 1:1; 4:2: 1; 2: 1:2; 4: 1:2; 2:2: 1; y 2: 1: 1. Se prefiere usar una masa sustancialmente igual de cada sacárido.

En general, los sacáridos capsulares se usan en forma de oligosacáridos. Estos se forman de forma conveniente mediante fragmentación del lipopolisacárido capsular purificado (p. ej., mediante hidrólisis), que normalmente irá seguida de la purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

La fragmentación de los polisacáridos se realizan, preferentemente, para dar un grado medio final de polimerización (GP) en el oligosacárido inferior a 30 (p. ej., entre 10 y 20, preferentemente de aproximadamente 10 para el serogrupo A; entre 15 y 25 para los serogrupos W135 e Y, preferentemente de aproximadamente 15-20; entre 12 y 22 para el serogrupo C; etc.). El GP puede medirse convenientemente mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante ensayos colorimétricos [134].

Si se realiza hidrólisis, se medirá el tamaño del hidrolizado con el fin de eliminar los oligosacáridos de longitud corta [135]. Esto se puede conseguir de varios modos, tales como ultrafiltración seguida por cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización inferior o igual a aproximadamente 6 se eliminan, preferentemente, para el serogrupo A y los inferiores a aproximadamente 4 son preferentemente eliminados para los serogrupos W135 e Y.

Los antígenos sacáridos MenC preferidos se divulgan en la referencia 133 y se usan en Menjugate™.

El antígeno sacárido puede modificarse químicamente. Esto es particularmente útil para reducir la hidrólisis para el serogrupo A [136; véase más adelante]. Se puede realizar la des-O-acetilación de los sacáridos meningocócicos. Para los oligosacáridos, la modificación puede tener lugar antes o después de la despolimerización.

Cuando una composición de la invención incluye un antígeno sacárido MENA, el antígeno es, preferentemente, un sacárido modificado en el que uno o más de los grupos hidroxilo en el sacárido nativo se ha/han reemplazado por un grupo de bloqueo [136]. Esta modificación mejora la resistencia a la hidrólisis y significa que el antígeno del serogrupo A se puede almacenar y usar en una formulación líquida en lugar de requerir liofilización.

ES 2 356 523 T3

El número de unidades de monosacárido que tienen grupos de bloqueo puede variar. Por ejemplo, todas, o sustancialmente todas, las unidades de monosacárido pueden tener grupos de bloqueo. Como alternativa, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de las unidades de monosacárido pueden tener grupos de bloqueo. Al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 unidades de monosacárido pueden tener grupos de bloqueo.

Asimismo, el número de grupos de bloqueo en una unidad de monosacárido puede variar. Por ejemplo, el número de grupos de bloqueo en una unidad de monosacárido puede ser 1 ó 2. Generalmente, el grupo de bloqueo estará en la posición 4 y/o la posición 3 de las unidades de monosacárido.

La unidad de monosacárido terminal puede o no tener un grupo de bloqueo en lugar de su hidroxilo nativo. Se prefiere que conserve un grupo hidroxilo anomérico libre en una unidad de monosacárido terminal con el fin de proporcionar un asa para reacciones adicionales (*p. ej.*, conjugación). Los grupos hidroxilo anoméricos se pueden convertir en grupos amino ((-NH₂ o -NH-E, donde E es un grupo protector de nitrógeno) mediante aminación reductora (usando, por ejemplo, NaBH₃CN/NH₄Cl), y después se puede regenerar una vez que otros grupos hidroxilo se han convertido en grupos de bloqueo.

Los grupos de bloqueo para reemplazar los grupos hidroxilo pueden ser directamente accesibles a través de una reacción de derivación del grupo hidroxilo, *es decir* reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo con otro grupo. Derivados adecuados de grupos hidroxilo que actúan como grupos de bloqueo son, por ejemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (*p. ej.*, éteres de sililo o éteres de alquilo) y acetales. Algunos ejemplos específicos de dichos grupos de bloqueo son alilo, Alloc, bencilo, BOM, t-butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, *etc.* Otros grupos de bloqueo que no son directamente accesibles y que reemplazan completamente al grupo hidroxilo incluyen alquilo C₁₋₁₂, alquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, NR¹ R² (R¹ y R² se definen en el párrafo siguiente), H, F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃, CCl₃, *etc.* Los grupos de bloqueo preferidos son los grupos aceptores de electrones.

Grupos de bloqueo preferidos son de la fórmula: -O-X-Y o -OR³ en la que: X es C(O), S(O) o SO₂; Y es alquilo C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ o arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados de forma independiente de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o Y es NR¹R²; R¹ y R² se seleccionan de forma independiente de H, alquilo C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆; o R¹ y R² pueden unirse para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂; R³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados de forma independiente de F, Cl, Br, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o R³ es arilo C₅₋₁₂ o arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃. Cuando R³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, normalmente está sustituido con 1, 2 ó 3 grupos como se ha definido anteriormente. Cuando R¹ y R² están unidos para formar un grupo heterocíclico C₃₋₁₂ saturado, quiere decir que R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno forman un grupo heterocíclico saturado que contiene cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (*p. ej.*, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). El grupo heterocíclico puede contener 1 ó 2 heteroátomos (tales como N, O o S) aparte del átomo de nitrógeno. Ejemplos de grupos heterocíclicos C₃₋₁₂ saturados son pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, azetidinilo y aziridinilo.

Los grupos de bloqueo O-X-Y y -OR³ se pueden preparar a partir de grupos -OH mediante procedimientos de derivación estándar, tal como la reacción del grupo hidroxilo con un haluro de acilo, haluro de alquilo, haluro de sulfonilo, *etc.* Por tanto, el átomo de oxígeno en O-X-Y es, preferentemente, el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo -X-Y en O-X-Y sustituye, preferentemente, al átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo. Como alternativa, los grupos de bloqueo pueden estar accesibles a través de una reacción de sustitución, tal como una sustitución de tipo Mitsunobu. Estos y otros procedimientos de preparación de los grupos de bloqueo a partir de grupos hidroxilo son bien conocidos.

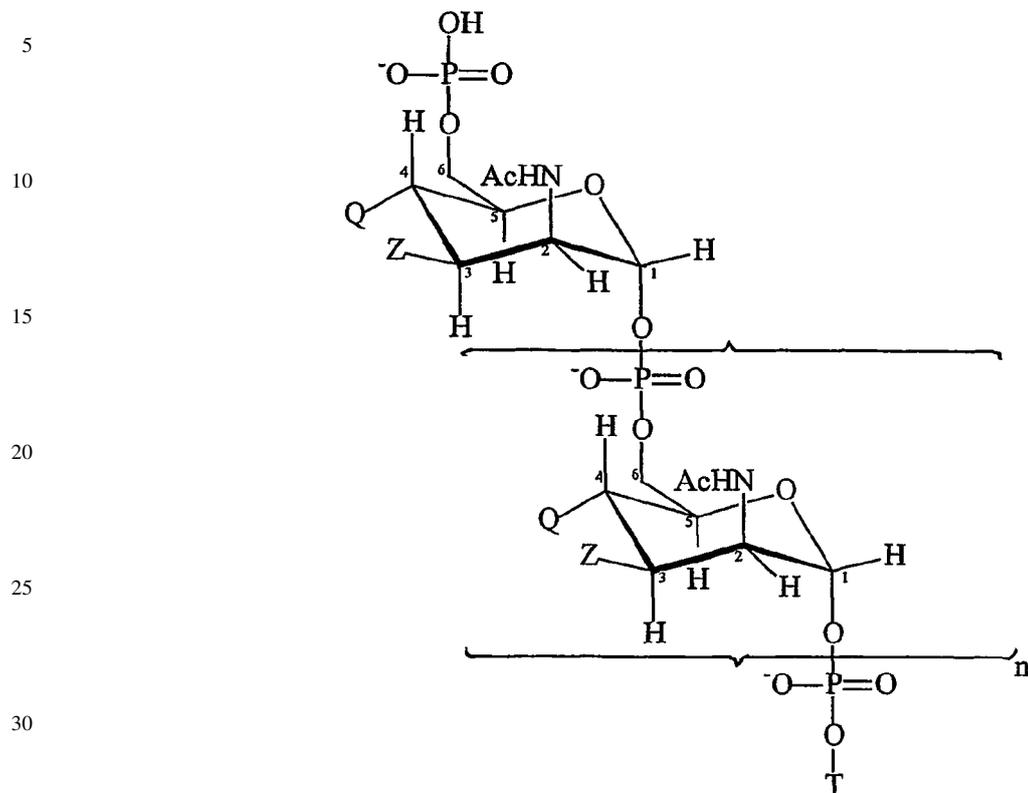
Más preferentemente, el grupo de bloqueo es -OC(O)CF₃ [137] o un grupo carbamato OC(O)NR¹ R², en el que R¹ y R² se seleccionan de forma independiente de alquilo C₁₋₆. Más preferentemente, R¹ y R² son ambos metilo, es decir el grupo de bloqueo es -OC(O)NMe₂. Los grupos de bloqueo de carbamato tienen un efecto estabilizador sobre el enlace glicosídico y se pueden preparar en condiciones moderadas.

Los sacáridos MenA modificados preferidos contienen *n* unidades de monosacárido, en las que al menos *h*% de las unidades de monosacárido no tienen grupos -OH en las posiciones 3 y 4. El valor de *h* es 24 o más (*p. ej.*, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100) y preferentemente es 50 o más. Los grupos -OH ausentes son, preferentemente, grupos de bloqueo como se ha definido anteriormente.

Otros sacáridos MenA modificados preferidos comprenden unidades de monosacárido, en las que al menos *s* de las unidades de monosacárido no tienen -OH en la posición 3 y no tienen -OH en la posición 4. El valor de *s* es al menos 1 (*p. ej.*, *por ejemplo* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90). Los grupos -OH ausentes son, preferentemente, grupos de bloqueo como se ha definido anteriormente.

ES 2 356 523 T3

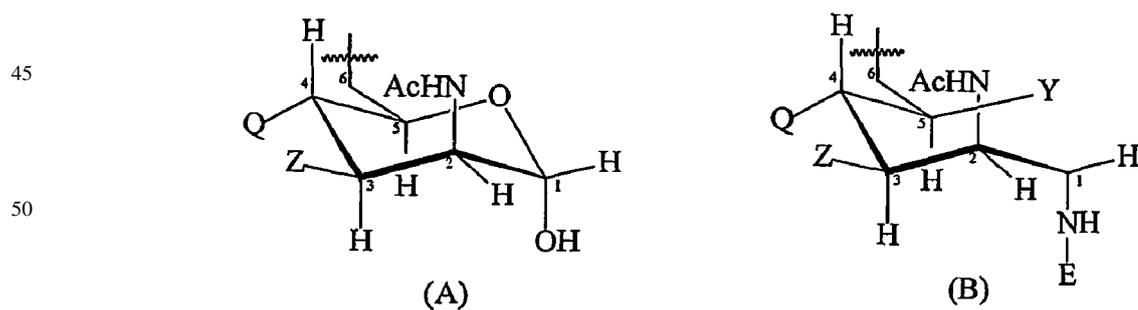
Sacáridos MenA modificados adecuados para usar con la invención tienen la fórmula:



en la que

n es un número entero de 1 a 100 (preferentemente un número entero de 15 a 25);

T es de la fórmula (A) o (B):



cada grupo Z se selecciona de forma independiente de OH o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente; y

cada grupo Q se selecciona de forma independiente de OH o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente;

Y se selecciona de OH o un grupo de bloqueo como se ha definido anteriormente;

E es H o un grupo protector de nitrógeno;

Y en la que más de aproximadamente 7% (p. ej., 8%, 9%, 10% o más) de los grupos Q son grupos de bloqueo.

ES 2 356 523 T3

Cada uno de los grupos $n+2$ Z pueden ser iguales o diferentes entre sí. Asimismo, cada uno de los grupos $n+2$ Q pueden ser iguales o diferentes entre sí. Todos los grupos Z pueden ser OH. Como alternativa, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60%, de los grupos Z puede ser OAc. Preferentemente, aproximadamente el 70% de los grupos Z son Oac, siendo el resto de los grupos Z OH o grupos de bloqueo como se ha definido con anterioridad. Al menos aproximadamente el 7% de los grupos Q son grupos de bloqueo. Preferentemente, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los grupos Q son grupos de bloqueo.

Las composiciones preferidas de la invención se pueden almacenar durante 28 días a 37°C y, después de ese periodo, menos del 1% de la cantidad total inicial del sacárido MENA conjugado estará no conjugado, en la que f es 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o menor.

Normalmente, los polisacáridos capsulares meningocócicos se preparan mediante un procedimiento que comprende las etapas de precipitación de polisacárido (*p. ej.*, usando un detergente catiónico), fraccionamiento en etanol, extracción en fenol frío (para eliminar la proteína) y ultracentrifugación (para eliminar el LPS) [*p. ej.*, referencia 138]. No obstante, un procedimiento más preferido [108] implica precipitación del polisacárido seguida por solubilización del polisacárido precipitado usando un alcohol menor. La precipitación se puede conseguir usando un detergente catiónico tal como sales de tetrabutilamonio y cetiltrimetilamonio (*p. ej.*, las sales de bromuro) o bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio. Particularmente preferido es el bromuro de cetiltrimetilamonio ("CTAB") [139]. La solubilización del material precipitado se puede conseguir usando un alcohol menor tal como metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioles *etc.*, pero el etanol es particularmente adecuado para solubilizar los complejos CTAB-polisacárido. Preferentemente se añade etanol al polisacárido precipitado para dar una concentración final (sobre la base del contenido total de etanol y agua) de entre 50% y 95%.

Después de la resolubilización, el polisacárido se puede tratar adicionalmente para eliminar contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en las que ni siquiera la menor contaminación es aceptable (*p. ej.*, para la producción de vacunas humanas). Normalmente esto implicará una o más etapas de filtración, por ejemplo filtración en profundo, se puede usar filtración a través de carbón activado, filtración por tamaño y/o ultrafiltración. Una vez filtrado para eliminar los contaminantes, el polisacárido se puede precipitar para tratamiento y/o procesamiento adicional. Esto se puede conseguir de forma conveniente intercambiando cationes (*p. ej.*, mediante la adición de sales de calcio o de sodio).

Como alternativa a la purificación se pueden obtener sacáridos capsulares de la presente invención mediante síntesis total o parcial, *por ejemplo* la síntesis Hib se divulga en la referencia 140 y la síntesis de MenA en la referencia 141.

Las composiciones de la invención comprenden sacáridos capsulares de al menos dos serogrupos de *N. meningitidis*. Los sacáridos se preparan, preferentemente, por separado (incluida cualquier fragmentación, conjugación, modificación *etc.*) y después se mezclan para dar una composición de la invención.

No obstante, cuando la composición comprende sacárido capsular del serogrupo A se prefiere que el sacárido del serogrupo A no se combine con el(los) otro(s) sacárido(s) hasta poco antes de usar, con el fin de minimizar el potencial de hidrólisis. Esto se puede alcanzar de forma conveniente teniendo el componente del serogrupo A (normalmente junto con los excipientes adecuados) en forma liofilizada y el(los) otro(s) componente(s) del serogrupo en forma líquida (también con los excipientes adecuados), usándose los componentes líquidos para reconstituir el componente de MenA liofilizado cuando se vaya a usar. Cuando se usa una sal de adyuvante como aluminio se prefiere incluir el adyuvante en el vial que contiene con la vacuna líquida y liofilizar el componente MenA sin adyuvante.

Por tanto, se puede preparar una composición de la invención a partir de un kit que comprende: (a) sacárido capsular de *N. meningitidis* del serogrupo A, en forma liofilizada; y (b) los otros antígenos de la composición en forma líquida. La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición de la invención, que comprende mezclar un sacárido capsular liofilizado de *N. meningitidis* del serogrupo A con los otros antígenos, en la que dichos antígenos están en forma líquida.

La invención también proporciona un kit que comprende: (a) un primer contenedor que contiene sacáridos capsulares de dos o más *N. meningitidis* de los serogrupos C, W135 e Y, todos en forma liofilizada; y (b) un segundo contenedor que contiene en forma líquida (i) una composición que, después de la administración a un sujeto, puede inducir una respuesta de anticuerpos en dicho sujeto, en el que la respuesta de anticuerpo es bactericida contra dos o más (*p. ej.*, 2 ó 3) linajes hipervirulentos A4, ET-5 y el linaje 3 de *N. meningitidis* del serogrupo B, (ii) sacáridos capsulares de ninguno o uno de *N. meningitidis* de los serogrupos C, W135 y Y, y, opcionalmente (iii) otros antígenos (véase más adelante) que no incluyen sacáridos capsulares meningocócicos, en los que la reconstitución de los contenidos del contenedor (a) mediante los contenidos del contenedor (b) proporciona una composición de la invención.

En cada dosis, la cantidad de un antígeno sacárido individual estará, en general, entre 1-50 μg (medidos en masa de sacárido), prefiriéndose aproximadamente 2,5 μg , 5 μg o 10 μg de cada uno. Con proporciones en peso: C:W135:Y de 1:1:1:1; 1:1: 1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2: 1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2: 1, por tanto, la cantidad representada por la figura 1 es, preferentemente, de aproximadamente 2,5 μg , 5 μg o 10 μg .

ES 2 356 523 T3

Para una proporción 1: 1: 1: 2 de la composición A:C:W:Y y 10 μg por sacárido, se administran 40 μg por dosis. Las composiciones preferidas tienen aproximadamente los siguientes μg de sacárido por dosis:

A	10	0	0	0	10	5	2,5
C	10	10	5	2,5	5	5	2,5
W135	10	10	5	2,5	5	5	2,5
Y	10	10	5	2,5	5	5	2,5

Las composiciones preferidas de la invención comprenden menos de 50 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 40 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 30 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 25 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 20 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 10 μg de sacárido meningocócico por dosis, pero, idealmente, las composiciones de la invención comprenden al menos 10 μg de sacárido meningocócico por dosis.

Los conjugados MenjugateTM y NeisVacTM MenC usan un adyuvante hidróxido, mientras que MeningitecTM usa un fosfato. Es posible en las composiciones de la invención adsorber algunos antígenos sobre un hidróxido de aluminio, pero tener otros antígenos asociados con un fosfato de aluminio. Para combinaciones tetravalentes de serogrupos, por ejemplo, se dispone de las permutaciones siguientes:

Serogrupo	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)															
	A	P	H	P	H	H	H	P	P	P	H	H	H	P	P	P
C	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
W135	P	H	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	P	P	H	P
Y	P	H	H	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P	P

Para combinaciones trivalentes de serogrupos de *N. meningitidis*, se dispone de las permutaciones siguientes:

Serogrupo	Sal de aluminio (H = un hidróxido; P = un fosfato)							
C	P	H	H	H	P	P	P	H
W135	P	H	H	P	H	P	H	P
Y	P	H	P	H	H	H	P	P

Haemophilus influenzae de tipo B

Cuando la composición incluye un antígeno de *H. influenzae* tipo B, normalmente incluirá un antígeno de sacárido capsular Hib. Los antígenos sacáridos de *H. influenzae* b son bien conocidos.

De forma ventajosa, el sacárido Hib está conjugado covalentemente a una proteína transportadora con el fin de potenciar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados de polisacáridos en general y del polisacárido capsular de Hib en particular está bien documentada [p. ej., referencias 142 a 150 etc.]. La invención puede usar cualquier conjugado Hib. Proteínas transportadoras adecuadas se describen más adelante y los transportadores preferidos para sacáridos Hib son CRM₁₉₇ ("HbOC"), toxoide del tétanos ("PRP-T") y el complejo de membrana externa de *N. meningitidis* ("PRP-OMP").

El resto sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (p. ej., poliribosilribitol fosfato de longitud completa (PRP)), pero se prefiere hidrolizar polisacáridos para formar oligosacáridos (p. ej., PM de ~ 1 a ~ 5 kDa).

ES 2 356 523 T3

Un conjugado preferido comprende un oligosacárido Hib unido covalentemente a CRM₁₉₇ a través de un ligador de ácido adípico [151, 152]. El toxoide del tétanos también es un transportador preferido.

La administración del antígeno Hib tiene como resultado, preferentemente, una concentración de anticuerpos anti-PRP de $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ y, más preferentemente, $\geq 1 \mu\text{g/ml}$.

Las composiciones de la invención pueden comprender más de un antígeno Hib.

Cuando una composición incluye un antígeno sacárido Hib se prefiere que tampoco incluya un adyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio, el antígeno Hib puede adsorberse en el adyuvante [153] o puede no adsorberse [154].

Los antígenos Hib puede estar liofilizados, *por ejemplo* junto con antígenos meningocócicos.

15 *Streptococcus pneumoniae*

Cuando la composición incluye un antígeno de *S. pneumoniae*, normalmente será un antígeno sacárido capsular que preferentemente está conjugado con una proteína transportadora [*p. ej.*, referencias 155 a 157]. Se prefiere incluir sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes se usan ampliamente, ya que son vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [158]. Por ejemplo, PrevNarTM [159] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F) con cada sacárido conjugado individualmente con CRM₁₉₇ mediante aminación reductora, con 2 μg de cada sacárido por dosis de 0,5 ml (4 μg de serotipo 6B) y con conjugados adsorbidos sobre adyuvante de fosfato de aluminio. Las composiciones de la invención incluye, preferentemente, al menos los serotipos 6B, 14, 19F y 23F. Los conjugados pueden adsorberse sobre fosfato de aluminio.

Como alternativa al uso de antígenos sacáridos de neumococos, la composición puede incluir uno o más antígenos polipeptídicos. Se dispone de secuencias genómicas para varias cepas de neumococos [160, 161] y se pueden someter a vacunología inversa [162-165] para identificar antígenos polipeptídicos adecuados [166, 167]. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más de los antígenos siguientes: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp130, como se define en la referencia 168. La composición puede incluir más de uno (*p. ej.*, 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 11, 12, 13 o 14) de estos antígenos.

En algunas formas de realización, la composición puede incluir los antígenos sacárido y polipeptídico de neumococo. Estos se pueden usar en mezcla simple, o el antígeno sacárido neumocócico puede conjugarse con una proteína neumocócica. Proteínas transportadoras adecuadas para dichas formas de realización incluyen los antígenos indicados en el párrafo anterior [168].

Los antígenos neumocócicos puede estar liofilizados, *por ejemplo* junto con antígenos meningocócicos y/o Hib.

40 *Conjugación covalente*

Normalmente, los sacáridos capsulares en las composiciones de la invención pueden estar conjugados a proteína(s) transportadora(s). En general, la conjugación potencia la inmunogenicidad de los sacáridos ya que los convierte de antígenos independientes de linfocitos T en antígenos dependientes de linfocitos T, lo que permite la iniciación de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas y es una técnica bien conocida [*p. ej.*, revisada en las referencias 169 y 142-150].

Las proteínas transportadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como el toxoide de difteria o el toxoide del tétanos. El toxoide de difteria CRM₁₉₇ [170-172] es particularmente preferido. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [173], péptidos sintéticos [174,175], proteínas del shock térmico [176,177], proteínas de pertussis [178,179], citocinas [180], linfoquinas [180], hormonas [180], factores de crecimiento [180], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células T CD4+ humanas de varios antígenos derivados de patógenos [181], proteína D de *H. influenzae* [182, 183], proteína de superficie neumocócica PspA [184], proteínas de captación de hierro [185], toxina A o B de *C. difficile* [186], *etc.* Los transportadores preferidos son el toxoide de difteria, el toxoide del tétanos, la proteína D de *H. influenzae* y CRM₁₉₇.

Dentro de una composición de la invención es posible usar más de una proteína transportadora, *por ejemplo* para reducir el riesgo de supresión del transportador. Por tanto, se pueden usar diferentes proteínas transportadoras para diferentes serogrupos, por ejemplo los sacáridos del serogrupo A se podrían conjugar con CRM₁₉₇ mientras que los sacáridos del serogrupo C podrían conjugarse con el toxoide del tétanos. También es posible usar más de una proteína transportadora para un antígeno sacárido concreto, por ejemplo los sacáridos del serogrupo A podrían estar en dos grupos, algunos conjugados con CRM₁₉₇ y otros conjugados con el toxoide del tétanos. No obstante, en general, se prefiere usar la misma proteína transportadora para todos los sacáridos.

Una proteína transportadora única podría transportar más de un antígeno sacárido [187]. Por ejemplo, Una proteína transportadora única podría tener conjugados sacáridos de los serogrupos A y C. Para conseguir este objetivo, los

ES 2 356 523 T3

sacáridos se pueden mezclar antes de la reacción de conjugación. No obstante, en general, se prefiere tener conjugados separados para cada serogrupo.

5 Se prefieren los conjugados con una proporción sacárido:proteína (p/p) de ente 1:5 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido). Se prefieren las proporciones de 1:2 y 5:1, como son más preferidas las proporciones entre 1:1,25 y 1:2,5. Para MenA y MenC se puede preferir un exceso de la proteína transportadora.

10 Los conjugados se pueden usar junto con la proteína transportadora libre [188]. Cuando una proteína transportadora dada está presente en forma tanto libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es, preferentemente, no superior al 5% de la cantidad total de la proteína transportadora en la composición como un todo y, más preferentemente, presente a menos del 2% en peso.

Se puede usar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier ligador adecuado cuando sea necesario.

15 Normalmente, el sacárido se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (p. ej., 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [189, 190 *etc.*]). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 148).

20 Se pueden establecer enlaces a través de un grupo ligador usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 191 y 192. Un tipo de enlace implica la aminación reductora del polisacárido, acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo ligador de ácido adípico y, después, acoplamiento de una proteína en el otro extremo del grupo ligador de ácido adípico [146,193,194]. Otros ligadores incluyen B-propionamido [195], nitrofenil-etilamina [196], haluros de haloacilo [197], enlaces glicosídicos [198], ácido 6-aminocaproico [199], ADH [200], restos de C₄ a C₁₂ [201] *etc.* Como alternativa al uso de un ligador, se puede usar enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender oxidación del polisacárido, seguida de aminación reductora con la proteína, tal como se ha descrito en, por ejemplo, las referencias 202 y 203.

30 Un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (p. ej., mediante sustitución de los grupos =O terminales con -NH₂), seguido por derivación con un diéster adípico (p. ej., N-hidroxisuccinimido diéster de ácido adípico) y se prefiere la reacción con la proteína transportadora. Otra reacción preferida usa activación con CDAP con una proteína D transportadora, por ejemplo MenA o MenC.

35 Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados se pueden separar. Hay muchos procedimientos adecuados, incluidos cromatografía hidrofóbica, ultrafiltración tangencial, diafiltración *etc.* [véanse también las referencias 204 y 205, *etc.*].

40 Cuando la composición de la invención incluye un oligosacárido conjugado, se prefiere que la preparación de los oligosacáridos preceda a la conjugación.

Antígenos polipeptídicos del serogrupo B adicionales y alternativos

45 La invención proporciona una composición que, después de administrar a un sujeto, puede inducir una respuesta de anticuerpos en dicho sujeto, en la que la respuesta de anticuerpos es bactericida contra dos o tres linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 de *N. meningitidis* del serogrupo B.

Aunque NaDA, 741, 936, 953 y 287 son antígenos requeridos para alcanzar esta amplia protección, otros antígenos polipeptídicos de MenB que pueden incluirse de forma adicional en las composiciones de la invención incluyen los que comprenden una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEC ID N° 650 de la referencia 8; SEC ID N° 878 de la referencia 8; SEC ID N° 884 de la referencia 8; SEC ID N° 4 de la referencia 9; SEC ID N° 598 de la referencia 10; SEC ID N° 818 de la referencia 10; SEC ID N° 864 de la referencia 10; SEC ID N° 866 de la referencia 10; SEC ID N° 1196 de la referencia 10; SEC ID N° 1272 de la referencia 10; SEC ID N° 1274 de la referencia 10; SEC ID N° 1640 de la referencia 10; SEC ID N° 1788 de la referencia 10; SEC ID N° 2288 de la referencia 10; SEC ID N° 2466 de la referencia 10; SEC ID N° 2554 de la referencia 10; SEC ID N° 2576 de la referencia 10; SEC ID N° 2606 de la referencia 10; SEC ID N° 2608 de la referencia 10; SEC ID N° 2616 de la referencia 10; SEC ID N° 2668 de la referencia 10; SEC ID N° 2780 de la referencia 10; SEC ID N° 2932 de la referencia 10; SEC ID N 2958 de la referencia 10; SEC ID N° 2970 de la referencia 10; SEC ID N° 2988 de la referencia 10, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene una identidad del 50% o más (p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con dichas secuencias; y/o (b) comprende un fragmento de al menos *n* aminoácidos consecutivos de dichas secuencias, en las que *n* es 7 o más (p. ej. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Fragmentos preferidos para (b) comprenden un epítipo de la secuencia relevante. Se pueden incluir más de uno (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6) de estos polipéptidos.

General

65 El término “que comprende” significa “que incluye” además de “que consiste en”, *por ejemplo* una composición “que comprende” X puede estar constituido sólo por X o puede incluir algo adicional, *por ejemplo* X + Y.

ES 2 356 523 T3

El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente”, *por ejemplo*, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y . Cuando sea necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significa que, cuando se alinean, que el porcentaje de aminoácidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en la sección 7.7.18 de la referencia 206. Una alineación preferida se determina mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con una penalización de apertura de hueco de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en la referencia 207.

El término “alquilo” se refiere a grupos “alquilo” en formas tanto lineal como ramificada. El grupo alquilo puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 heteroátomos seleccionados de -O-, -NH- o -S-. El grupo alquilo también puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 enlaces dobles y/o triples. No obstante, el término “alquilo” normalmente se refiere a grupos alquilo que no tienen interrupciones con heteroátomo o interrupciones con dobles o triples enlaces. Cuando se hace referencia a alquilo C_{1-12} , se quiere decir que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 12 (*p. ej.*, C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12}). De forma similar, cuando se hace referencia a alquilo C_{1-6} , se quiere decir que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 6 (*p. ej.*, C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6).

El término “cicloalquilo” incluye grupos cicloalquilo, policicloalquilo y cicloalqueno, así como combinaciones de éstos con grupos alquilo, tales como grupos cicloalquilalquilo. El grupo cicloalquilo puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 heteroátomos seleccionados de -O-, -NH- o -S-. No obstante, el término “cicloalquilo” normalmente se refiere a grupos cicloalquilo que no tienen interrupciones con heteroátomos. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen grupos ciclopropilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilmetilo y adamantilo. Cuando se hace referencia a cicloalquilo C_{3-12} , se quiere decir que el grupo cicloalquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (*p. ej.*, C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12}).

El término “arilo” se refiere a un grupo aromático, tal como fenilo o naftilo. Cuando se hace referencia a arilo C_{5-12} , se quiere decir que el grupo cicloalquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 5 y 12 (*p. ej.*, C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12}).

El término “arilo C_{5-12} -alquilo C_{1-6} ” se refiere a grupos tales como bencilo, feniletilo y naftilmetilo.

Grupos protectores de nitrógeno incluyen grupos sililo (tales como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acilo (tales como ftalimidas, trifluoroacetamidas, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, t-butoxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Z o Cbz), 9-fluorometoxicarbonilo (Fmoc), 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (tales como β -trimetilsililetanosulfonilo (SES)), derivados de sulfenilo, alquilo C_{1-12} , bencilo, bencilidrido, tritilo, 9-fenilfluorenilo *etc.* Un grupo protector de nitrógeno preferido es Fmoc.

Las secuencias incluidas para facilitar la clonación o purificación *etc.*, no necesariamente contribuyen a la invención y pueden omitirse o eliminarse.

Se apreciará que pueden existir anillos de azúcar en forma abierta y cerrada y que, mientras que las formas cerradas se muestran en las fórmulas estructurales de la presente memoria descriptiva, las formas abiertas también quedan abarcadas por la invención.

Modos para realizar la invención

Proteína híbrida $\Delta G287-953$

El ADN que codifica la proteína 287 de la cepa meningocócica 394/98 del serogrupo B y la proteína 953 de la cepa meningocócica 2996 del serogrupo B se digirió y ligó junto con una corta secuencia ligadora, para dar un plásmido codificador de la secuencia de aminoácidos SEC ID 7. El plásmido se transfeccionó en *E. coli* y las bacterias se cultivaron para expresar la proteína.

Después del crecimiento adecuado se recogieron las bacterias y se purificó la proteína. Del cultivo, las bacterias se centrifugaron y el sedimento se homogeneizó en presencia de tampón acetato 50 mM (Ph 5) con una proporción en volumen del sedimento:tampón de 1: 8. La lisis se realizó usando un homogeneizador de alta presión (AVESTIN, 4 ciclos a 14000 psi). Tras la lisis se añadió urea a una concentración final de 5M, seguida por agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. El pH se redujo de 6 a 5 usando tampón acetato 200 mM (pH 4) + urea 5M. La mezcla se centrifugó a 16800 g durante 60 minutos a 2-8°C. El sobrenadante se recogió y se filtró mediante SARTOBRA P (0,45 - 0,22 μ m SARTORIUS).

ES 2 356 523 T3

La proteína en el sobrenadante fue estable durante ≥ 30 días a -20°C y durante ≥ 15 días a $2-8^{\circ}\text{C}$.

5 La proteína se purificó adicionalmente en una columna de intercambio catiónico (SPFF, Amersham Biosciences) con elución usando NaCl 350 mM + acetato 50 mM + urea 5 M a pH 5,00. La mayoría de las impurezas estaba presente en el flujo continuo. Un lavado de pre-elución usando una concentración de NaCl menor (180 mM) eliminó de forma ventajosa dos proteínas de *E. coli* contaminantes.

10 El material eluido se ajustó a un pH 8 (usando TRIS/HCl 200 mM + urea 5 M pH 9) y se purificó adicionalmente en una columna de Q Sepharosa HP (Amersham) con elución usando NaCl 150 mM + TRIS/HCl 20 mM a pH 8,00 en urea 5 M. De nuevo, un lavado de pre-elución con niveles reducidos de sales (90 mM) fue útil para eliminar las impurezas.

15 El material eluido filtrado de la columna Q HP se diluyó 1:2 usando PBS a pH 7,00 (NaCl 150 mM + fosfato potásico 10 mM, pH 7,00) y después se diafiltró de nuevo contra 10 volúmenes de PBS a pH 7,00 mediante ultrafiltración tangencial. Al final de la diafiltración, el material se concentró 1,6 veces a aproximadamente 1,2 mg/ml de proteínas totales. Usando una membrana de corte de 30.000 Da (membrana de celulosa regenerada 50 cm^2 , Millipore PLCTK 30) fue posible dializar el material con un rendimiento de aproximadamente 90%.

20 *Proteína híbrida 936- Δ G741*

El ADN que codifica la proteína 936 de la cepa meningocócica 2966 del serogrupo B y la proteína 741 de la cepa meningocócica MC58 del serogrupo B se digirió y ligó junto con una corta secuencia ligadora, para dar un plásmido codificador de la secuencia de aminoácidos SEC ID 8. El plásmido se transfeccionó en *E. coli* y las bacterias se cultivaron para expresar la proteína. La proteína recombinante no se secretó, sino que permaneció soluble dentro de la bacteria.

Después de un crecimiento adecuado, las bacterias se centrifugaron para dar una pasta húmeda y se trataron del siguiente modo:

- 30
- Homogeneización mediante sistema de alta presión en presencia de fosfato sódico 20 mM, pH 7,00.
 - Centrifugación y clarificación mediante filtración ortogonal.

35

 - Cromatografía en columna catiónica (SP Sepharose Fast Flow), con elución mediante NaCl 150 mM en fosfato sódico 20 mM, pH 7,00.
 - Cromatografía en columna aniónica (Q Sepharose XL) con recolección continua.

40

 - Cromatografía en columna hidrofóbica (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub) con elución por fosfato sódico 20 mM a pH 7,00.
 - Diafiltración contra PBS a pH 7,4 con un corte de 10 Kd.

45

 - Filtración estéril final y almacenamiento a -20°C .

La proteína en el material final fue estable durante al menos 3 meses tanto a -20°C como a $2-8^{\circ}\text{C}$.

50 *Proteína NadA^{(NL)(C)}*

El ADN que codifica la proteína NadA de la cepa meningocócica 2966 del serogrupo B y se digirió para eliminar la secuencia que codifica su extremo C, para dar un plásmido codificador de la secuencia de aminoácidos SEC ID 1. El plásmido se transfeccionó en *E. coli* y las bacterias se cultivaron para expresar la proteína. La proteína recombinante se secretó en el medio de cultivo y el péptido líder estaba ausente en la proteína secretada (SEC ID 2). El sobrenadante se trató del siguiente modo:

- 60
- Concentración 7X y diafiltración contra el tampón TRIS/HCl 20 mM a pH 7,6 mediante UF de flujo transversal (corte de 30 Kd).
 - Cromatografía en columna catiónica (Q Sepharose XL), con elución mediante NaCl 400 mM en TRIS/HCl 20 mM, pH 7,6.

65

 - Etapa de cromatografía en columna hidrofóbica (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub) con elución NaCl 50 mM en TRIS/HCl a pH 7,6.
 - Cromatografía en columna cerámica con hidroxilapatita (HA Macro.Prep) con elución mediante fosfato sódico 200 mM pH 7,4.

ES 2 356 523 T3

- Dialfiltración (corte 30 Kd) contra PBS a pH 7,4.
- Filtración estéril final y almacenamiento a -20°C.

5 La proteína en el material final fue estable durante al menos 6 meses tanto a -20°C como a 2-8°C.

La proteína NadA es susceptible a la degradación y las formas truncadas de NadA pueden detectarse mediante transferencia de tipo western o mediante espectrometría de masas (p. ej., mediante MALDI-TOF) que indica una pérdida de PM de hasta 10 kDa. Los productos de degradación se pueden separar de la NadA nativa mediante filtración en gel (p. ej., usando la columna TSK 300SWXL, precolumna TSKSWXL, TOSOHAAS). Dicha filtración da tres picos: (i) un primer pico con tiempo de retención 12,637 min y PM aparente 885,036 Da; (ii) tiempo de retención 13,871 min y PM aparente 530,388 Da; (iii) tiempo de retención 13,871 min y un PC 530,388 Da. El análisis de dispersión de luz de los tres picos revela valores reales de PM de (i) 208500 Da, (ii) 98460 Da, (iii) 78760 Da. Por tanto, el primer pico contiene agregados de NadA y el tercer pico contiene productos de degradación.

Dado que el peso molecular predicho de NadA^{(NL)(C)} es 34,113 Da, el pico (ii) contiene una proteína trimérica, que es el antígeno deseado.

20 *Combinaciones antigénicas*

Ratones fueron inmunizados con una composición que comprende las tres proteínas y un adyuvante de hidróxido de aluminio. Para los fines comparativos, las tres proteínas también se sometieron a ensayo una por una. Se usaron diez ratones por grupo. La mezcla indujo altos títulos bactericidas contra varias cepas:

	Cepa meningocócica ^(Serogrupo)							
	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38	394/98 ^(B)	H44176 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)	C ₁₁ ^(C)
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000
(2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4
(3)	32000	8000	-	-	-	8000	-	32000
Mezcla	32000	32000	65000	16000	260000	65000	>65000	8000
'-' indica que esta cepa no contiene gen de NadA								

En ratones individuales, la triple mezcla indujo títulos bactericidas elevados y consistentes contra las tres cepas del serogrupo B a partir de las cuales derivan los antígenos individuales:

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2996	32768	16384	65536	32768	32768	65536	65536	32768	65536	8192
MC58	65536	32768	65536	65536	65536	8192	65536	32768	32768	65536
394/98	65536	4096	16384	4096	8192	4096	32768	16384	8192	16384

55 *Combinación y comparación con OMV*

En otros experimentos, los antígenos adyuvados (20 µg de cada antígeno por dosis) se administraron en combinación con 10 µg de OMV preparados a partir de la cepa H44/76 (Noruega) o la cepa 394/99 (Nueva Zelanda). Los controles positivos fueron el AcMo anticapsular SEAM-3 para el serogrupo B o los sacáridos capsulares conjugados-CRM197 para otras cepas. Los resultados (títulos bactericidas) se muestran en la Tabla 1. La mezcla casi siempre da mejores títulos que las simples OMV y, además, la adición de la mezcla con OMV casi siempre potencia de forma significativa la eficacia de las OMV. Además, en muchos casos, la mezcla de antígenos coincide o supera la respuesta observada con el control positivo.

ES 2 356 523 T3

Ensayos de linajes hipervirulentos

Los antígenos siguientes se sometieron a ensayo contra diversas cepas del serogrupo B a partir de diversos linajes hipervirulentos:

- (a) NadA^{(NL)(C)}
- (b) ΔG287 - 953
- (c) 936 - ΔG741
- (d) una mezcla de (a), (b) y (c)
- (e) OMV preparadas a partir de la cepa H44/76 (Noruega)
- (f) OMV preparadas a partir de la cepa 394/98 (Nueva Zelanda)
- (g) Una mezcla de ΔG287 y (e)
- (h) Una mezcla de (d) y (e)
- (i) Una mezcla de (d) y (f)

Como control positivo se usó SEAM-3.

Los resultados fueron los siguientes, expresados en forma del porcentaje de cepas en el linaje hipervirulento indicado en el que el título bactericida en suero superó 1024:

	Nº de cepas	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	S - 3
A4	4	50	50	0	100	25	25	25	100	100	+
ET-5	8	25	75	88	100	71	14	71	100	100	+
Linaje 3	13	0	75	15	93	8	85	8	92	93	+
ET-37	4	11	22	0	33	0	0	0	22	25	+

Contra cepas de referencia concretas, los títulos bactericidas fueron los siguientes:

	Cepa	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	S-3
A4	961-5945	128	2048	<8	2048	262144	8192	262144	262144	4096	8192
ET-5	44/76	<4	2048	32768	131072	524288	8192	524288	524288	524288	16384
Linaje 3	394/98	<4	1024	32	4096	< 4	16384	256	16384	16384	16384
ET-37	LPN17592	2048	1024	256	4096	< 8	< 8	512	16384	65536	1024

Por tanto, las composiciones (d), (h) e (i) inducen respuestas de anticuerpos bactericidas contra una amplia variedad de cepas de meningococos del serogrupo B a partir de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y el linaje 3. Los títulos usando las composiciones (h) e (i) fueron, en general, mayores que con (d), pero la cobertura de las cepas en los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 no fue mejor.

La cobertura de las cepas no tipadas también fue alta con las composiciones (d), (h) e (i).

65 Análisis del dominio en N terminal de NadA

Se sabe que la proteína purificada NadA de *N. meningitidis* se une a células epiteliales humanas [17] (p. ej., células Chang, células HeLa, células Hep-2) y la *E. coli* recombinante que expresa NadA muestran un fenotipo adherente [18]

ES 2 356 523 T3

Estas *E. coli* también pueden invadir células epiteliales y NadA⁺ en *E. coli* se puede detectar en células de Chang mediante inmunofluorescencia (tras la permeabilización de la membrana) y mediante microscopía electrónica. Por tanto, se cree que la NadA funciona como una adhesina y una invagina para las células epiteliales.

5 Sobre la base del análisis de la estructura secundaria, la NadA madura se ha subdividido en tres dominios putativos: Un dominio globular en N-terminal (aa 24-87), una región interna en α -hélice (aa 88-350) con una propensión enrollado-enrollamiento alta y un anclaje de membrana en el extremo C (aa 351-405). Se investigó el papel del dominio globular en el extremo N en la interacción huésped-célula.

10 Un gen nadA truncado codificador de una proteína desprovista de los aminoácidos 30-87 se clonó en el vector pET-21 (pET-NadA Δ 30-87) y se expresó en la cepa BL21 de *E. coli* (DE3). Los aminoácidos 24-29 se conservaron para permitir el procesamiento del péptido líder y la correcta maduración de la proteína. La transferencia de tipo western y el análisis FACS confirmaron que NadA Δ 30-87 se había expresado y formado oligómeros sobre la superficie celular de *E. coli*, es decir la delección del dominio en el extremo N no interfiere con la expresión, exportación y localización
15 en la membrana de NadA. No obstante, la cepa de *E. coli* recombinante perdió completamente la capacidad para adherirse a las células epiteliales de Chang. Por tanto, el dominio en el extremo N está implicado en la actividad de la adhesina.

Para investigar más qué parte del dominio del extremo N está implicada en la interacción, la región se dividió
20 adicionalmente en tres subdominios putativos. aminoácidos 24-42, que contienen una región prevista en α -hélice con residuos hidrófobos; aminoácidos 43-70, la parte interna sin una estructura secundaria definida predicha; y los aminoácidos 71-87 que contienen otra estructura predicha en α -hélice. Se generaron tres construcciones, codificando cada una una proteína delecionada de un subdominio único, y, después, se introdujeron en *E. coli* BL21 (DE3), obteniendo las cepas siguientes: BL21 (DE3)/pET-NadA Δ 24-42, BL21 (DE3)/pET-NadA Δ 43-70 y BL21
25 (DE3)/pET-NadA Δ 71-87. La localización en la superficie de los oligómeros se confirmó mediante transferencia de tipo western y análisis FACS, pero la adhesión a las células epiteliales de Chang no fue mejor que la cepa de *E. coli* BL21 (DE3)/pET. Estos resultados, confirmados también usando análisis de microscopía de inmunofluorescencia, indican que todo el dominio globular en el extremo N de NadA es importante en la interacción con células humanas.

30

Combinación con conjugados meningocócicos y/o Hib

La composición triple MenB se combina con una mezcla de conjugados oligosacáridos para los serogrupos C,
35 W135 e Y, para dar una vacuna que contiene los antígenos siguientes:

	Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
40	Conjugado del serogrupo C	10 μ g de sacárido + 12,5-25 μ g de CRM ₁₉₇
45	Conjugado del serogrupo W135C	10 μ g de sacárido + 6,6-20 μ g de CRM ₁₉₇
50	Conjugado del serogrupo Y	10 μ g de sacárido + 6,6-20 μ g de CRM ₁₉₇
55	Δ G287-953	20 μ g de polipéptido
	936- Δ G741	20 μ g de polipéptido
	NadA	20 μ g de polipéptido

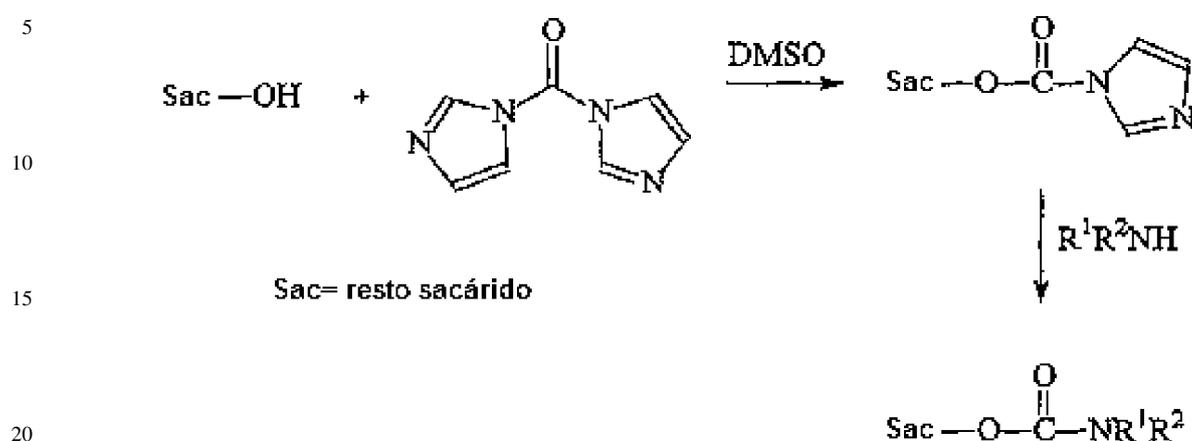
Se prepara una vacuna similar, incluido el conjugado de MENA (10 μ g de sacárido + 12,5-33 μ g de CRM₁₉₇) y/o
60 un conjugado de HbOC Hib (10 μ g de sacárido + 2-5 μ g de CRM₁₉₇).

Uso de sacárido MenA modificado

65 El lipopolisacárido capsular se purificó a partir de MenA y se hidrolizó para dar el oligosacárido MenA. El polisacárido (2 g) se hidrolizó a 50°C en tampón de acetato sódico 50 mM, pH 4,75 a una concentración del polisacárido de 10 mg/ml durante aproximadamente 4 horas [135]. Tras la hidrólisis, la solución se secó mediante evaporación rotatoria.

ES 2 356 523 T3

El oligosacárido se activó usando el siguiente esquema de reacción:



25 El oligosacárido se disolvió en DMSO para dar una concentración del sacárido de 10 mg/ml. De acuerdo con una proporción molar de oligosacárido:CDI de 1:20, se añadieron 21,262 g de CDI y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El compuesto MenA-CDI resultante se purificó mediante precipitación selectiva en una mezcla de 80:20 (v/v) de acetona:DMSO seguida por centrifugación. La eficiencia de la reacción de activación se calculó que era de aproximadamente 67,9% determinando la proporción entre el imidazol libre y el imidazol unido.

30 En la segunda etapa de reacción, el oligosacárido MENA-CDI se solubilizó en DMSO a una concentración de sacárido de aproximadamente 10 mg/ml. De acuerdo con una proporción molar de unidad de MENA-CDI:DMA 1:100, se añadieron 36,288 g de 99% de dimetilamina clorhidrato (es decir, R^1 y $R^2 = \text{Me}$) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El producto de reacción se liofilizó y se re-solubilizó en 10 mg/ml de solución en agua.

35 Para eliminar el reactivo de reacción de bajo peso molecular (en particular, la dimetilamina (DMA)) de la preparación de oligosacárido, se realizó una etapa de diálisis a través de una membrana MWCO de 3,5 kDa (SpectraPor™). Se llevaron a cabo cuatro etapas de diálisis: (i) 16 horas contra 2 l de cloruro sódico 1M (factor de diálisis 1:20), (ii) 16 horas contra 2 l de cloruro sódico 0,5M (factor de diálisis 1:20), (iii) y (iv) 16 horas contra 2 l de WFI (factor de diálisis 1:20). Para mejorar la purificación también se realizó una etapa de diafiltración a través de una membrana MWCO 1kDa (Centricon™).

40 El producto MenA-CDI-DMA purificado se tamponó a pH 6,5 en L-histidina 25 mM (Fluka™).

45 Para preparar los conjugados del sacárido MenA modificado (MenA-CDI-DMA), el procedimiento global fue el siguiente:

- 50
- 55
- 60
- Hidrólisis del polisacárido para dar fragmentos oligosacáridos
 - Cálculo del tamaño de los fragmentos de oligosacárido
 - Aminación reductora de los grupos aldehídos terminales en los oligosacáridos medidos
 - Protección de los grupos $-\text{NH}_2$ terminales por grupo Fmoc antes de la reacción de CDI
 - Desprotección intrínseca de los grupos NH_2 durante la reacción de DMA
 - activación de los grupos NH_2 terminales mediante SIDEA (ácido N-hidroxisuccinimida adípico)
 - unión covalente a la proteína CRM₁₉₇.

65 El conjugado oligosacárido MenA modificado es mucho más resistente a la hidrólisis que su homólogo natural a temperaturas elevadas. Después de 28 días a 37°C, por ejemplo, el porcentaje de sacárido liberado es 6,4% para el oligosacárido modificado frente al 23,5% para el antígeno natural. Además, los títulos inducidos por los oligosacáridos modificados no son significativamente menores que los obtenidos usando las estructuras de azúcar nativas.

ES 2 356 523 T3

El conjugado de MENA modificado se combina con los conjugados de MenC, MenW125 y MenY como sustituto para el conjugado del oligosacárido sin modificar. Esta mezcla tetravalente se mezcla con los tres polipéptidos de MenB para dar una vacuna eficaz contra los serogrupos A, B, C, W135 e Y de *N. meningitidis* en una dosis única.

5

Combinaciones neumocócicas

Las tres proteínas de MENB combinadas se mezclan con conjugados sacáridos de neumocócicos para dar una concentración final de 2 µg/dosis de cada uno de los serotipos neumocócicos (doble para el serotipo 6B). Por tanto, la vacuna reconstituida contiene los siguientes antígenos:

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
Conjugado del serogrupo A	5 µg de sacárido +6,25-16,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo C	5 µg de sacárido +6,25-12,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo W135C	5 µg de sacárido +3,3-10 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo Y	5 µg de sacárido +3,3-10 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 4	2 µg de sacárido +2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 9V	2 µg de sacárido +2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 14	2 µg de sacárido +2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 18C	2 µg de sacárido +2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 19F	2 µg de sacárido +2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 23F	2 µg de sacárido +2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado neumocócico del serotipo 6B	4 µg de sacárido +5 µg de CRM ₁₉₇

TABLA 1

	2996	NGH38	M4215	MC58	44/76	CU385	N44/89	394/98	M01- 240149	NM092	NM008	8Z198	961- 5945	G2136	5/99	F6124	8Z133	LPN 17592	240539
Tipado	B:2b;P1.5a;2a	B:NT;P1.3	B:15;P:7.16	B:15;P:7.16b	B:15;P:11.16	B:4;P:1.15	B:4;7;P:1.19.15	B:4;P:1.4	B:4;P:7.4	B:4;P:1.4	B:4;P:1.4	B:NT	B:2b;P:21.16B	B:	B:2b;P:1.5.2	A	ctIT:	W135	PI.5
ET:	otros	otros	n.d.	ET5	ET5	ET5	ET5	lin.3	lin.3	lin3	lin3	lin3	A4	A4	A4	sill	sl		
Control positivo	32768	32768	32768	16384	16384	>16384	8192	16384	8192	32768	8192	16384	8192	32768	1024	1024		1024	4096
Mezcla de antígenos	4096	4096	65536	32768	65536	>65536	>4096	8192	2048	>4096	4096	4096	2048	2048	>4096	8192	16384	4096	>8192
Antígenos+ H44/76	16384	8192	>65536	32768	524288	>65536	>4096	16384	8192	>4096	>4096	>4096	>8192	2048	>4096	32768	32768	16384	>8192
OMVs																			
Antígenos+ 394/98	8192	8192	>65536	32768	>65536	>65536	>4096	65536	>8192	>4096	>4096	>4096	2048	8192	>4096	65536	65536	65536	>8192
OMV																			
OMV (Noruega)	<4	1024	8192	2048	262144	256	<8	4096	<4	<8	<8	<4	>8192	<8	1024	<4	<8	<8	>4096
OMV (NZ)	512	<4	128	2048	<4	<8	<8	32768	>8192	4096	1024	4096	<16	n.d.	<8	4096	1024	<8	>4096

ES 2 356 523 T3

Referencias (cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia)

- [1] **Maiden** y col. (1998) *PNAS USA* 95:3140-3145.
- 5 [2] **Armand** y col. (1982) *J. Biol. Stand.* 10:335-339.
- [3] **Cadoz** y col. (1985) *Vaccine* 3:340-342.
- [4] **Bjune** y col. (1991) *Lancet* 338(8775): 1093-96
- 10 [5] **Parkhill** y col. (2000) *Nature* 404:502-506.
- [6] **Tettelin** y col. (2000) *Science* 287: 1809-1815.
- 15 [7] WO00/66791.
- [8] WO99/24578.
- [9] WO99/36544.
- 20 [10] WO99/57280.
- [11] WO00/22430.
- 25 [12] WO00/66741.
- [13] **Pizza** y col. (2000) *Science* 287: 1816-1820.
- [14] WO01/64920.
- 30 [15] WO01/64922.
- [16] WO03/020756.
- 35 [17] **Comanducci** y col. (2002) *J. Exp. Med.* 195: 1445-1454.
- [18] WO03/01 0194.
- [19] UK patent application 0227346.4.
- 40 [20] WO03/063766.
- [21] **Masignani** y col. (2003) *J Exp Med* 197:789-799.
- 45 [22] <http://neisseria.org/nm/typing/mist!>
- [23] **Pettersson** y col. (1994) *Microb Pathog* 17(6):395-408.
- [24] **Welsch** y col. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups Band C *Neisseria meningitidis* strains.
- 50 [25] **Santos** y col. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of *N. meningitidis*.
- 55 [26] WO03/009869.
- [27] WO01/30390.
- 60 [28] **Almeida & Alpar** (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- [29] **Agarwal & Mishra** (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.
- 65 [30] WO00/53221.
- [31] **Jakobsen** y col. (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.

ES 2 356 523 T3

- [32] **Wu** y col. (1997) *J Infect Dis* 175:839-846.
- [33] **Bergquist** y col. (1998) *APM IS* 106:800-806.
- 5 [34] **Baudner** y col. (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.
- [35] **Ugozzoli** y col. (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.
- 10 [36] **Paoletti** y col. (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
- [37] WO00/56365.
- [38] **Gennaro** (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- 15 [39] *Vaccine Design*. (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. *Plenum*.
- [40] WO00/231 05.
- [41] WO90/14837.
- 20 [42] Patente de EE.UU. 5,057,540.
- [43] WO96/33739.
- 25 [44] EP-A-0109942.
- [45] WO96/11711.
- [46] WO00/07621.
- 30 [47] **Barr** y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [48] **Sjlanderet** y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- 35 [49] **Niikura** y col. (2002) *Virology* 293:273-280.
- [50] **Lenz** y col. (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [51] **Pinto et al.** (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- 40 [52] **Gerber** y col. (2001) *Virology* 75:4752-4760.
- [53] WO03/024480
- 45 [54] WO03/024481
- [55] **Gluck** y col. (2002) *Vaccine* 20:B1 0-B16.
- [56] EP-A-0689454.
- 50 [57] **Johnson** y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [58] **Evans** y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- 55 [59] **Meraldi** y col. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [60] **Pajak** y col. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [61] **Kandimalla** y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- 60 [62] WO02/26757.
- [63] WO99/62923.
- 65 [64] **Krieg** (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [65] **McCluskie** y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32: 179-185.

ES 2 356 523 T3

- [66] WO98/401 00.
- [67] Patente de EE.UU. 6,207,646.
- 5 [68] Patente de EE.UU. 6,239,116.
- [69] Patente de EE.UU. 6,429,199.
- [70] **Kandimalla** y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- 10 [71] **Blackwell** y col. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [72] **Krieg** (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- 15 [73] WO01/95935.
- [74] **Kandimalla** y col. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [75] **Bhagat** y col. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- 20 [76] WO03/035836.
- [77] WO95/17211.
- 25 [78] WO98/42375.
- [79] **Beignon** y col. (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [80] **Pizza** y col. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- 30 [81] **Pizza** y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [82] **Scharton-Kersten** y col. (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- 35 [83] **Ryan** y col. (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [84] **Partidos** y col. (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [85] **Peppoloni** y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- 40 [86] **Pine** y col. (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [87] **Domenighini** y col. (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- 45 [88] WO99/40936.
- [89] WO99/44636.
- [90] **Singh et al**] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- 50 [91] WO99/27960.
- [92] Patente de EE.UU. 6,090,406
- 55 [93] Patente de EE.UU. 5,916,588
- [94] EP-A-0626169.
- [95] WO99/52549.
- 60 [96] WO01/21207.
- [97] WO001/21152.
- 65 [98] **Andrianov** y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [99] **Payne** y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31: 185-196.

ES 2 356 523 T3

- [100] **Stanley** (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [101] **Jones** (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- 5 [102] WO99/11241.
- [103] WO94/00153.
- [104] WO98/57659.
- 10 [105] Solicitudes de patentes europeas 0835318, 0735898 y 0761231.
- [106] WO96/37222; Patente de EE.UU. 6,333,036.
- 15 [107] **Costantino** y col. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- [108] WO03/007985.
- [109] **Bell** (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 1187-1188.
- 20 [110] **Iwarson** (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [111] **Gerlich** y col. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- 25 [112] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [113] Del **Guidice** y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- [114] **Gustafsson** y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- 30 [115] **Rappuoli** y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [116] WO01/52885.
- 35 [117] **Fukasawa** y col. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- [118] **Rosenqvist** y col. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- [119] **Sutter** y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- 40 [120] **Zimmerman & Spann** (1999) *Am Fam Physician* 59: 113-118, 125-126.
- [121] **Robinson & Torres** (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
- 45 [122] **Donnelly** y col. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
- [123] **Scott-Taylor & Dalgleish** (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
- [124] **Apostolopoulos & Plebanski** (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
- 50 [125] **Ilan** (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
- [126] **Dubensky** y col. (2000) *Mol Med* 6:723-732.
- 55 [127] **Robinson & Pertmer** (2000) *Adv Virus Res* 55: 1-74.
- [128] **Donnelly** y col. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.
- [129] **Davis** (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.
- 60 [130] **Charalambous & Feavers** (2001) *J Med Microbiol* 50:937-939.
- [131] **Westerink** (2001) *Int Rev Immunol* 20:251-261.
- 65 [132] **Grothaus** y col. (2000) *Vaccine* 18:1253-1263.
- [133] **Jones** (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.

ES 2 356 523 T3

- [134] **Ravenscroft** y col. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- [135] **Costantino** y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- 5 [136] WO03/080678.
- [137] **Nilsson & Svensson** (1979) *Carbohydrate Research* 69: 292-296)
- [138] **Frash** (1990) p.123-145 of *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- 10 [139] **Inzana** (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.
- [140] **Kandil** y col. (1997) *Glycoconj J* 14:13-17.
- 15 [141] **Berkin** y col. (2002) *Chemistry* 8:4424-4433.
- [142] **Lindberg** (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [143] **Buttery & Moxon** (2000) *JR Coli Physicians Lond* 34:163-168.
- 20 [144] **Ahmad & Chapnick** (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- [145] **Goldblatt** (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- 25 [146] Patente europea 0477508.
- [147] Patente de EE.UU. 5,306,492.
- [148] WO98/42721.
- 30 [149] **Dick** y col. in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [150] **Hermanson** Bioconjugate Techniques, *Academic Press, San Diego* (1996) ISBN: 0123423368.
- 35 [151] **Kanra** y col. (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42:421-427.
- [152] **Ravenscroft** y col. (2000) *Dev Biol* (Basel) 103: 35-47.
- [153] WO97/00697.
- 40 [154] WO02/00249.
- [155] **Watson** (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- 45 [156] **Rubin** (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [157] **Jedrzejewski** (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [158] **Zielen** y col. (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.
- 50 [159] **Darkes & Plosker** (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
- [160] **Tettelin** y col. (2001) *Science* 293:498-506.
- 55 [161] **Hoskins** y col. (2001) *J Bacteriol* 183:5709-5717.
- [162] **Rappuoli** (2000) *Curr Opin Microbiol* 3:445-450
- [163] **Rappuoli** (2001) *Vacuna* 19:2688-2691
- 60 [164] **Masignani** y col. (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:895-905.
- [165] **Mora** y col. (2003) *Drug Discov Today* 8:459-464.
- 65 [166] **Wizemann** y col. (2001) *Infect Immun* 69:1593-1598.
- [167] **Rigden** y col. (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:143-168.

ES 2 356 523 T3

- [168] WO02/22167.
- [169] **Ramsay** y col. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- 5 [170] Anónimo (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [171] **Anderson** (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [172] **Anderson** y col. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- 10 [173] EP-A-0372501.
- [174] EP-A-0378881.
- 15 [175] EP-A-0427347.
- [176] WO93/17712
- [177] WO94/03208.
- 20 [178] WO98/58668.
- [179] EP-A-0471177.
- 25 [180] WO91/01146
- [181] **Falugi** y col. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- [182] EP-A-059461 0.
- 30 [183] WO00/56360.
- [184] WO02/091998.
- 35 [185] WO01/72337
- [186] WO00/61761.
- [187] W099/42130
- 40 [188] WO96/40242
- [189] **Lees** y col. (1996) *Vaccine* 14:190-198.
- 45 [190] WO95/08348.
- [191] Patente de EE.UU. 4,882,317
- [192] Patente de EE.UU. 4,695,624
- 50 [193] **Porro** y col. (1985) *Mol Immunol* 22:907-919.s
- [194] EP-A-0208375
- 55 [195] WO00/1 0599
- [196] **Gever** y col. *Med. Microbiol. Immunol*, 165:171-288 (1979).
- [197] Patente de EE.UU. 4,057,685.
- 60 [198] Patentes de EE.UU. 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [199] Patente de EE.UU. 4,459,286.
- 65 [200] Patente de EE.UU. 4,965,338
- [201] Patente de EE.UU. 4,663,160.

ES 2 356 523 T3

[202] Patente de EE.UU. 4,761,283

[203] Patente de EE.UU. 4,356,170

5 [204] **Lei** y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.

[205] WO00/38711; Patente de EE.UU. 6,146,902.

10 [206] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel y col., eds., 1987) Supplement 30.

[207] **Smith & Waterman** (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición que, después de su administración a un sujeto, puede inducir una respuesta de anticuerpos en dicho sujeto, en la que la respuesta de anticuerpos es bactericida contra dos o más linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 de *N. meningitidis* del serogrupo B, que comprende: (i) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de más del 95% con la SEC ID 2; (ii) una proteína híbrida representada por la fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que $n=2$; A es la secuencia de aminoácidos Met-Ala; X_1 es una secuencia de aminoácidos con una identidad de más del 95% con la SEC ID 6; L_1 es la secuencia de aminoácidos SEC ID 9; X_2 es una secuencia de aminoácidos con una identidad de más del 95% con la SEC ID 5; L_2 está ausente; y B está ausente; e (iii) una proteína híbrida representada por la fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que $n=2$; A es el aminoácido Met; X_1 es una secuencia de aminoácidos con una identidad de más del 95% con la SEC ID 4; L_1 es la secuencia de aminoácidos SEC ID 9; X_2 es una secuencia de aminoácidos con una identidad de más del 95% con la SEC ID 3; L_2 está ausente; y B está ausente.

15 2. Una composición que, después de su administración a un sujeto, puede inducir una respuesta de anticuerpos en dicho sujeto, en la que la respuesta de anticuerpos es bactericida contra dos o más linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 de *N. meningitidis* del serogrupo B, que comprende: (i) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de más del 99% con la SEC ID 2; (ii) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de más del 99% con la SEC ID 7 y (iii) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de más del 99% con la SEC ID 8, a condición de que dicha secuencia no sea la SE ID N° 15.

25 3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende: (i) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID 1; (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID 7; y (iii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID 8.

30 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que además comprende antígenos sacáridos de los serogrupos meningocócicos Y, W135, C y (opcionalmente) A.

35 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* de tipo B.

40 6. La composición de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que el antígeno sacárido está conjugado con una proteína transportadora.

45 7. La composición de la reivindicación 6, en la que el antígeno sacárido está conjugado con un transportador seleccionado de: toxoide de difteria, toxoide del tétanos, CRM₁₉₇ o proteína D de *H. influenzae*.

50 8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.

55 9. La composición de cualquier reivindicación precedente para su uso como medicamento.

60 10. La composición de cualquier reivindicación precedente para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad provocada por una *Neisseria*

65 11. El uso de una composición de cualquier reivindicación precedente en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad provocada por una *Neisseria*.

ES 2 356 523 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID 1- NadA de la cepa 2996, con delección en el extremo C

5 MKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDID
EDGTITKKDATAAADVEADDFKGLGLKVVNTLTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADT
DAALADTDAALDATTNALNKLGENITTTFAEETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDE
10 TNTKADEAVKTANEAKQTAETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAAGTANTAADKAEVAACKVTD
IKADIATNKDNIAKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLD
KTVS DLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVG
15

SEC ID 2- NadA de la cepa 2996, con delección en el extremo C y péptido líder procesado

20 ATNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAAADVEADDFKG
LGLKVVNTLTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATrNALNKLGE
NITTTFAEETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAETK
25 QNVDAKVKAAETAAGKAEAAAAGTANTAADKAEVAACKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADVTR
EESDSKFVRIDGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDKTVSDLRKETRQGLAEQAALSG
LFQPY NVG
30

SEC ID 3-ΔG741 de la cepa MC58

35 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNT
GKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQF
RIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDL
AAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKSYSGLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIG LAAKQ
40

SEC ID 4 -936 de la cepa MC58 con péptido líder procesado

45 VSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQRNNQTKGYTPQISVV
GYNRHLLLLLQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRAT
LLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAQITQKVST TVGVQKVITLYQNYVQR

50 SEC ID 5 -953 de la cepa MC58 con péptido líder procesado

ATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPIANLQSGSQ
HFTDHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNGLKLVSDGNLTMHGKTAPVKLKAKEFNCYQSP
55 MEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGMDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ

SEC ID 6-ΔG287 de la cepa MC58

60 SPDVKSADTLKPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGQGAPSAQGSQDMAAVSEENT
GNGGAVTADNPKNEDEVAQNMPQNAAGTDSSTPNHTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQP
ANQPDMANAADGMQGGDDPSAGGQNAGNTAAQGANQAGNNQAAGSSDPIPASNPAPANGGS
65 NFRVLDLANGVLIDGPSQNITLTHCKGDSCSGNNFLDEEVQLKSEFEKLSADKISNYKKDGKN

ES 2 356 523 T3

DKFVGLVADSVQMKGINQYIIFYKPKPTSFARFRRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAV
SLTGHSNIFAPEGNYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPAKGEMLAGAAVYNGEVLHFHTEN
5 GRPYPTRGRFAAKVDFGSKSVDGIIDSGDDLHMGTKQFKAAIDGNGFKGTWTENGSGDVSGK
FYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEOD

10 SEC ID 7 - Híbrido 287-953

MASPDVKSADTLKPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGGGAPSAQGGQDMAAVSEE
15 NTGNGGAAATDKPKNEDEGAQNMPQNAADTDSLTPNHTPASNMPAGNMENQAPDAGESE
QPANQPDMAANTADGMQGGDDPSAGGENAGNTAAQGTNQAENNQTAGSQNPASSTNPSATNS
GGDFGRRTNVGNSVVIDGPSQNILTHCKGDCSGNNFLDEEVQLKSEFEKLSADKISNYKGD
20 GKNDGKNDKFVGLVADSVQMKGINQYIIFYKPKPTSFARFRRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADT
LIVDGEAVSLTGHSNIFAPEGNYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPSKGEMLAGTAVYNGEV
LHFHTENGRPSPSRGRFAAKVDFGSKSVDGIIDSGDGLHMGTKQFKAAIDGNGFKGTWTENG
GGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQDGSGGGGATYKVDEYHA
25 NARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPVANLQSGSQHFTDHLKSADI
FDAAQYPDIRFVSTKFNFNKLVSDGNLTMHGKTAPVKLKAEFNFCYQSPMAKTEVCGGDF
STTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ*

30 SEC ID 8 - Híbrido 936-741

MVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLRQNNQTKGYTPQISV
35 VGYNRHLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRA
TLLGISPATQARVIVTYGNVTYVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGGG
40 GVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSL
TGKLNKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQ
FRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVD
45 LAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGI FGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ*

SEC ID 9- Ligador

50 GSGGGG

55 SEC ID 10- secuencia de 741

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDS
60 LNTGKLNKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMKVAK
RQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELN
VDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTV
65 NGIRHIGLAAKQ

ES 2 356 523 T3

SEC ID 11- secuencia de 741

5 CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSL
NTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFL
VSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELA
AAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGE KVHEIGIAGKQ

10 SEC ID 12- secuencia de 741

15 CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGA
EKTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
NPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYG
RIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGE
20 KVHEIGIAGKQ

SEC ID 13- Motivo CpG

25 gtcgtt

SEC ID 14- Motivo CpG

30 ttcgtt

SEC ID 15- Secuencia rehusada de 936-ΔG741 de la referencia 16

35 MKPKPHTVRTLIAAIFSLALSGCVSAVIGSAAVGAKSAVDRRRTTGAQTDDNVMALRIETT
ARSYLRQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLGQVATEGEKQFVGGIARSEQAAEGVYNYITVAS
LPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVYVMGILTPEEQAQITQKVSTTVG
40 VQKVITLYQNYVQRGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTDQSVRKNEKLLAA
QGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQEQI
QDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQG
45 NGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVK
TVNGIRHIGLAAKQ