



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 182**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/095** (2006.01)  
**A61K 39/102** (2006.01)  
**A61K 39/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08075538 .2**  
96 Fecha de presentación : **04.10.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1961426**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **Vacunas combinadas contra la meningitis.**

30 Prioridad: **02.10.2003 GB 0323102**  
**28.05.2004 GB 0412052**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.07.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.07.2011**

73 Titular/es: **NOVARTIS AG.**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es: **Contorni, Mario**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 182 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 combinadas contra la meningitis

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a inmunización contra meningitis bacteriana, y particularmente a inmunización combinada contra meningitis bacteriana producida por múltiples patógenos.

**Técnica anterior**

10 La *N. meningitidis* es un patógeno humano Gram-negativo no móvil que coloniza la faringe y causa meningitis (y, ocasionalmente, septicemia en ausencia de meningitis). Causa tanto enfermedad endémica como epidémica. Tras la introducción de la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib), la *N. meningitidis* es la principal causa de meningitis bacteriana en EE.UU. Un tercer patógeno responsable de la meningitis bacteriana es *Streptococcus pneumoniae*, pero ahora está disponible una vacuna eficaz (PrevNar™ [1]). Al igual que la vacuna contra Hib, la vacuna neumocócica se basa en antígenos de sacáridos capsulares conjugados.

15 Basándose en el polisacárido capsular del organismo se han identificado diversos serogrupos de *N. meningitidis* que incluyen (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y y Z). El serogrupo A es el patógeno casi siempre implicado en la enfermedad epidémica en el África subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la gran mayoría de los casos en Estados Unidos y en la mayoría de los países desarrollados. Los serogrupos W135 e Y son responsables del resto de los casos en EE.UU. y países desarrollados. Aunque el polisacárido capsular es un inmunógeno protector eficaz, cada serogrupo requiere un antígeno de sacárido separado, y esta solución no es adecuada para inmunizar contra el serogrupo B. Por tanto, el éxito reciente con vacunas de sacáridos conjugados contra el serogrupo C (Menjugate™ [2], Meningitec™ y NeisVac-C™) no ha tenido impacto sobre la enfermedad producida por los serogrupos A, B, W135 o Y; por el contrario, presentan una presión selectiva hacia la emergencia de estos serogrupos como causa principal de enfermedad meningocócica.

20 Desde hace muchos años se conoce una vacuna tetravalente inyectable de polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, Y y W135 [3,4] y está autorizada para uso humano. Los polisacáridos en esta vacuna están sin conjugar y están presentes a una relación de peso 1:1:1:1 [5] con 50 µg de cada polisacárido purificado. Aunque es eficaz en adolescentes y adultos, induce una mala respuesta inmunitaria y corta duración de la protección y no puede usarse en lactantes [por ejemplo, ref. 6]. Además, las vacunas tienen la desventaja de requerir la reconstitución a partir de formas liofilizadas en el momento de uso.

25 Una vacuna ha demostrado ser evasiva para el serogrupo B. Se han probado vacunas basadas en vesículas de la membrana externa [por ejemplo, ref. 7], pero la protección está normalmente restringida a la cepa usada para preparar la vacuna.

30 Por tanto, sigue existiendo la necesidad de una vacuna que proteja contra los serogrupos A, C, W135 e Y meningocócicos en niños, y también una que no requiera reconstitución antes de la administración. Además, sigue existiendo la necesidad de una vacuna que proteja ampliamente contra el serogrupo B.

35 El documento WO 02/00249 describe una composición de vacuna multivalente, un conjugado del polisacárido capsular de *H. influenzae* de tipo b y dos o más polisacáridos bacterianos adicionales.

40 El documento WO 2004/067030 desvela una composición inmunogénica inyectable que comprende sacáridos capsulares de al menos dos de los serogrupos A, C, W 135 e Y de *Neisseria meningitidis*. Los sacáridos capsulares están conjugadas con proteína(s) portadora(s) y/o son oligosacáridos. En la composición, (i) la composición comprende <50 µg de sacárido meningocócico por dosis y/o (ii) la composición comprende además un antígeno de uno o más del (a) serogrupo B de *N. meningitidis*; (b) *Haemophilus influenzae* de tipo b; y/o (c) *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de sacáridos en las composiciones están generalmente conjugados con un vehículo.

**Divulgación de la invención**

45 La invención satisface todas estas diversas necesidades y se basa en ocho hallazgos separados. Primero, los inventores han encontrado que los sacáridos capsulares conjugados de los serogrupos C, W135 e Y meningocócicos son seguros e inmunogénicos en seres humanos cuando se combinan en una dosis única. Segundo, han encontrado que este efecto es retenido cuando se añade un sacárido capsular conjugado del serogrupo A. Tercero, han encontrado que estos antígenos conjugados pueden combinarse establemente en una dosis acuosa única sin la necesidad de liofilización. Cuarto, han encontrado que puede lograrse la amplia protección contra infección por el serogrupo B usando un número pequeño de antígenos de polipéptidos definidos. Quinto, han encontrado que estos antígenos de polipéptidos pueden combinarse con los antígenos de sacáridos sin pérdida de la eficacia protectora para cualquiera de los cinco serogrupos. Sexto, han encontrado que la eficacia se retiene incluso si se añade un conjugado de Hib. Séptimo, han encontrado que la eficacia de un conjugado del serogrupo W135 se potencia mediante la adición de antígenos de proteínas derivados de una cepa del serogrupo B. Finalmente, han encontrado que la adición de un conjugado de Hib a conjugados meningocócicos potencia la

actividad global contra el serogrupo W135 de meningococo.

La invención proporciona la composición inmunogénica acuosa de cualquiera de las reivindicaciones 1-6. La composición puede incluir adicionalmente antígenos de sacáridos capsulares conjugados de los serogrupos C e Y y, opcionalmente, A. Adicionalmente incluye antígenos de polipéptidos del serogrupo B de *N. meningitidis*.

- 5 Los antígenos de sacáridos preferidos son oligosacáridos.

### **Serogrupos C, W135 e Y**

- 10 Las técnicas para preparar polisacáridos capsulares a partir de meningococos se conocen desde hace muchos años y normalmente implican un procedimiento que comprende las etapas de precipitación de polisacáridos (por ejemplo, usando un detergente catiónico), fraccionamiento con etanol, extracción en fenol frío (para eliminar la proteína) y ultracentrifugación (para eliminar LPS) [por ejemplo, véase la ref. 8].

- 15 Un procedimiento [9] más preferido implica la precipitación de polisacáridos seguido de la solubilización del polisacárido precipitado usando un alcohol inferior. La precipitación puede lograrse usando un detergente catiónico tal como sales de tetrabutilamonio y cetiltrimetilamonio (por ejemplo, las sales de bromuro), o bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio. El bromuro de cetiltrimetilamonio ('CTAB') es particularmente preferido [10]. La solubilización del material precipitado puede lograrse usando un alcohol inferior 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 complejos de CTAB-polisacárido. El etanol puede añadirse al polisacárido precipitado dando una concentración de etanol final (basada en el contenido total de etanol y agua) de entre el 50% y el 95%.

- 20 Después de la resolubilización, el polisacárido puede tratarse adicionalmente para eliminar los contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en las que incluso no es aceptable una contaminación menor (por ejemplo, para la producción de vacunas humanas). Esto implicará normalmente una o más etapas de filtración, por ejemplo, puede usarse filtración profunda, filtración a través de carbono activo, filtración por tamaño y/o ultrafiltración.

- 25 Una vez se ha filtrado para eliminar los contaminantes, el polisacárido puede precipitarse para el tratamiento y/o procesamiento posteriores. Esto puede lograrse convenientemente intercambiando cationes (por ejemplo, mediante la adición de sales de calcio o de sodio).

Después de la purificación, los sacáridos capsulares están conjugados con proteínas portadoras como se describe más adelante.

- 30 Otros procedimientos y procedimientos alternativos para la purificación y conjugación de los sacáridos meningocócicos se desvelan en las referencias 11 y 12.

Como alternativa a la purificación, los sacáridos capsulares de la presente invención pueden obtenerse mediante síntesis total o parcial, por ejemplo, la síntesis de Hib se desvela en la ref. 13 y la síntesis de MenA en la ref. 14.

- 35 El sacárido puede estar químicamente modificado, por ejemplo, puede estar O-acetilado o des-O-acetilado. Cualquier des-O-acetilación o hiper-acetilación tal puede ser en posiciones específicas en el sacárido. Por ejemplo, la mayoría de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en la posición C-7 y/o C-8 de los residuos ácido siálico, pero aproximadamente el 15% de las cepas aisladas clínicas carecen de estos grupos O-acetilo [15,16]. La acetilación no parece que afecte la eficacia protectora (por ejemplo, a diferencia del producto Menjugate™, el producto NeisVac-C™ usa un sacárido des-O-acetilado, pero ambas vacunas son eficaces). El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades de disacáridos de ácido siálico-galactosa. El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto que la unidad de repetición de disacáridos incluye glucosa en lugar de galactosa. Al igual que los sacáridos del serogrupo C, los sacáridos de MenW135 y MenY tienen O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [17]. Cualquier modificación química tal tiene lugar preferentemente antes de la conjugación, pero puede tener lugar alternativa o adicionalmente durante la conjugación.

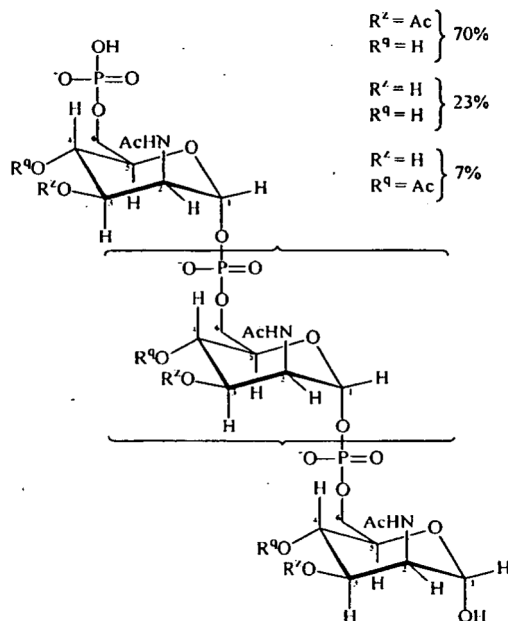
- 45 Los sacáridos de diferentes serogrupos se purifican preferentemente por separado, y entonces pueden combinarse, tanto antes como después de la conjugación.

### **Serogrupo A**

- 50 Las composiciones de la invención pueden incluir un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo A. El sacárido puede purificarse y conjugarse de la misma forma que para los serogrupos C, W135 e Y (véase anteriormente), aunque es estructuralmente diferente - mientras que las cápsulas de los serogrupos C, W 135 e Y están basadas en ácido siálico (ácido *N*-acetil-neuramínico, NeuAc), la cápsula del serogrupo A está basada en *N*-acetil-manosamina, que es el precursor natural del ácido siálico. El sacárido del serogrupo A es particularmente susceptible a la hidrólisis, y su inestabilidad en medios acuosos significa que (a) la inmunogenicidad de vacunas

líquidas contra el serogrupo A disminuye con el tiempo, y (b) el control de calidad es más difícil debido a la liberación de productos de la hidrólisis de sacáridos en la vacuna.

- 5 El sacárido capsular de MenA nativo es un homopolímero de *N*-acetil-D-mannosamina-1-fosfato ligado en ( $\alpha$ 1→6) con O-acetilación parcial en C3 y C4. El principal enlace glucosídico es un enlace fosfodiéster en 1-6 que implica el grupo hemiacetal de C1 y el grupo alcohol de C6 de la D-mannosamina. La longitud de cadena promedio es 93 monómeros. Tiene la siguiente fórmula:



- 10 Los inventores han preparado un antígeno de sacárido modificado que retiene la actividad inmunogénica del sacárido del serogrupo A nativo, pero que es mucho más estable en agua. Los grupos hidroxilo unidos en los carbonos 3 y 4 de las unidades del monosacárido están sustituidas por un grupo de bloqueo [ref. 18].

- 15 Puede variar el número de unidades de monosacáridos que tienen grupos de bloqueo en lugar de hidroxilos. Por ejemplo, todas o sustancialmente todas las unidades de monosacáridos pueden tener grupos de bloqueo. Alternativamente, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o el 90% de las unidades de monosacáridos 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 ó 30 unidades de monosacáridos pueden tener grupos de bloqueo.

Asimismo, puede variar el número de grupos de bloqueo en una unidad de monosacáridos. Por ejemplo, el número de grupos de bloqueo en cualquier unidad de monosacáridos particular puede ser 1 ó 2.

- 20 La unidad de monosacáridos terminal puede o puede no tener un grupo de bloqueo en lugar de su hidroxilo nativo. Se prefiere retener un grupo hidroxilo anomérico libre en una unidad de monosacáridos terminal con el fin de proporcionar una manipulación para otras reacciones (por ejemplo, conjugación). Los grupos hidroxilo anoméricos pueden convertirse en grupos amino ( $-\text{NH}_2$  o  $-\text{NH}-\text{E}$  en la que E es un grupo protector de nitrógeno) mediante aminación reductora (usando, por ejemplo,  $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{Cl}$ ), y entonces puede regenerarse después de que otros grupos hidroxilo se hayan convertido en grupos de bloqueo.

- 25 Los grupos de bloqueo para sustituir grupos hidroxilo pueden estar directamente accesibles mediante una reacción de derivatización del grupo hidroxilo, es decir, reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo por otro grupo. Derivados de grupos hidroxilo adecuados que actúan de grupos de bloqueo son, por ejemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (por ejemplo, éteres silícicos o éteres alquílicos) y acetales. Algunos ejemplos específicos de tales grupos de bloqueo son alilo, Aloc, bencilo, BOM, t-butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, etc. Otros grupos de bloqueo que no están directamente accesibles y que sustituyen completamente el grupo hidroxilo incluyen alquilo  $\text{C}_{1-12}$ , alquilo  $\text{C}_{3-12}$ , arilo  $\text{C}_{5-12}$ , aril  $\text{C}_{5-12}$ -alquilo  $\text{C}_{1-6}$ ,  $\text{NR}^1\text{R}^2$  ( $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  se definen en el siguiente párrafo), H, F, Cl, Br,  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CO}_2$ (alquilo  $\text{C}_{1-6}$ ), CN,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CCl}_3$ , etc.

- 35 Grupos de bloqueo preferidos son de fórmula:  $-\text{O}-\text{X}-\text{Y}$  o  $-\text{OR}^3$  en las que: X es C(O), S(O) o  $\text{SO}_2$ ; Y es alquilo  $\text{C}_{1-12}$ , alcoxi  $\text{C}_{1-12}$ , cicloalquilo  $\text{C}_{3-12}$ , arilo  $\text{C}_{5-12}$  o aril  $\text{C}_{5-12}$ -alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , pudiendo estar cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2 ó 3 grupos independientemente seleccionados de F, Cl, Br,  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CO}_2$ (alquilo  $\text{C}_{1-6}$ ), CN,  $\text{CF}_3$  o  $\text{CCl}_3$ ; o Y es  $\text{NR}^1\text{R}^2$ ;  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  se seleccionan independientemente de H, alquilo  $\text{C}_{1-12}$ , cicloalquilo  $\text{C}_{3-12}$ , arilo  $\text{C}_{5-12}$ , aril  $\text{C}_{5-12}$ -alquilo  $\text{C}_{1-6}$ ; o  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  pueden unirse para formar un grupo heterocíclico  $\text{C}_{3-12}$  saturado;  $\text{R}^3$  es alquilo  $\text{C}_{1-12}$  o cicloalquilo  $\text{C}_3$ .

12, pudiendo estar cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2 ó 3 grupos independientemente seleccionados de F, Cl, Br, CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1-6</sub>), CN, CF<sub>3</sub> o CCl<sub>3</sub>; o R<sup>3</sup> es arilo C<sub>5-12</sub> o aril C<sub>5-12</sub>-alquilo C<sub>1-6</sub>, pudiendo estar cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 ó 5 grupos seleccionados de F, Cl, Br, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1-6</sub>), CN, CF<sub>3</sub> o CCl<sub>3</sub>. Si R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1-12</sub> o cicloalquilo C<sub>3-12</sub>, normalmente está sustituido con 1, 2 ó 3 grupos como se definen anteriormente. Si R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se unen para formar un grupo heterocíclico C<sub>3-12</sub> saturado significa que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con el átomo de nitrógeno forman un grupo heterocíclico saturado que contiene cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>). El grupo heterocíclico puede contener 1 ó 2 heteroátomos (tales como N, O o S) distintos del átomo de nitrógeno. Ejemplos del grupo heterocíclico C<sub>3-12</sub> saturado son pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, azetidinilo y aziridinilo.

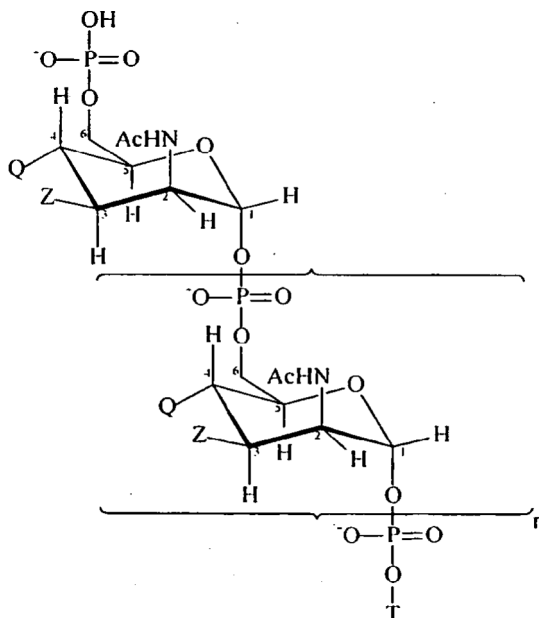
10 Los grupos de bloqueo -O-X-Y y -OR<sup>3</sup> pueden prepararse a partir de grupos -OH mediante procedimientos de derivatización estándar tales como reacción del grupo hidroxilo con un haluro de acilo, haluro de alquilo, haluro de sulfonilo, etc. Por tanto, el átomo de oxígeno en -O-X-Y es preferentemente el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo -X-Y en -O-X-Y sustituye preferentemente el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo. Alternativamente, los grupos de bloqueo pueden estar accesibles mediante una reacción de sustitución tal como una sustitución de tipo Mitsunobu. Estos y otros procedimientos de preparación de grupos de bloqueo a partir de grupos hidroxilo son muy conocidos.

Más preferentemente, el grupo de bloqueo es -OC(O)CF<sub>3</sub> [19], o un grupo carbamato -OC(O)NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de alquilo C<sub>1-6</sub>. Más preferentemente, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son ambos metilo, es decir, el grupo de bloqueo es -OC(O)NMe<sub>2</sub>. Los grupos de bloqueo carbamato tienen un efecto estabilizador sobre el enlace glucosídico y pueden prepararse bajo condiciones suaves.

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

25 Otros sacáridos de MenA modificados preferidos comprenden unidades de monosacáridos en las que al menos *s* de las unidades de monosacáridos no tienen -OH en la posición 3 y no tienen -OH en la posición 4. El valor de *s* es al menos 1 (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 definen anteriormente.

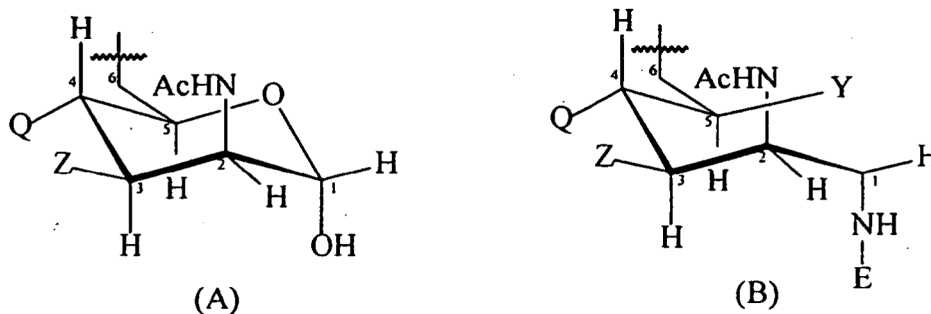
30 Los sacáridos de MenA modificados adecuados para uso con la invención tienen la fórmula:



en la que

*n* es un número entero de 1 a 100 (preferentemente un número entero de 5 a 25, más preferentemente 15-25);

T es de fórmula (A) o (B):



cada grupo Z se selecciona independientemente de OH o un grupo de bloqueo como se define anteriormente; y  
 cada grupo Q se selecciona independientemente de OH o un grupo de bloqueo como se define anteriormente;  
 Y se selecciona de OH o un grupo de bloqueo como se define anteriormente;

5 E es H o un grupo protector de nitrógeno;

y en los que más de aproximadamente el 7% (por ejemplo, 8%, 9%, 10% o más) de los grupos Q son grupos de bloqueo.

10 Cada uno de los  $n+2$  grupos Z pueden ser iguales o diferentes entre sí. Asimismo, cada uno de los  $n+2$  grupos Q pueden ser iguales o diferentes entre sí. Todos los grupos Z pueden ser OH. Alternativamente, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o el 60% de los grupos Z pueden ser OAc. Preferentemente, aproximadamente el 70% de los grupos Z son OAc, siendo el resto de los grupos Z grupos OH o de bloqueo como se define anteriormente. 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.

15 Grupos de bloqueo preferidos son grupos aceptores de electrones. Sin desear ceñirse a ninguna teoría, se cree que los enlaces glucosídicos son inestables a la hidrólisis debido a la ayuda de un ataque nucleófilo intramolecular de un grupo hidroxilo de sacárido en el enlace glucosídico (es decir, mediante la formación de un producto intermedio cíclico). Cuanto mayor sea la nucleofilia del grupo hidroxilo mayor será la tendencia al ataque nucleófilo intramolecular. Un grupo de bloqueo aceptor de electrones tiene el efecto de deslocalizar el par de iones oxígeno, disminuyendo así la nucleofilia del oxígeno y aumentando la tendencia al ataque nucleófilo intramolecular.

20 Por tanto, para proteger contra el serogrupo A, las composiciones acuosas pueden incluir un sacárido modificado de MenA como se define anteriormente.

Las composiciones preferidas de la invención pueden almacenarse durante 28 días a 37°C y, después de ese periodo, menos del  $f\%$  de la cantidad total inicial de sacárido de MenA conjugado estará sin conjugado, siendo  $f$  20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o menos.

## 25 **Conjugación covalente**

30 Los sacáridos capsulares en composiciones de la invención se conjugarán normalmente con proteína(s) portadora(s). En general, la conjugación potencia la inmunogenicidad de sacáridos a medida que los convierte de antígenos independientes de T en antígenos dependientes de T, permitiendo así el cebado de memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas y es una técnica muy conocida [por ejemplo, revisada en las refs. 20 a 29].

35 Las proteínas portadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos tales como el toxoide diftérico o el toxoide tetánico, o el mutante de la toxina diftérica CRM<sub>197</sub> [30-32]. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [33], péptidos sintéticos [34,35], proteínas de choque térmico [36,37], proteínas de pertussis [38,39], citocinas [40], linfocinas [40], hormonas [40], factores de crecimiento [40], proteínas artificiales que comprenden epítopes de linfocitos T CD4<sup>+</sup> humanos múltiples de diversos antígenos derivados de patógenos [41] tales como la proteína N19 [42], la proteína D de *H. influenzae* [43,44], neumolisina [45], proteína PspA de la superficie neumocócica [46], proteínas de captación de hierro [47], toxina A o B de *C. difficile* [48], toxinas bacterianas mutantes (por ejemplo, toxina del cólera 'CT' o toxina lábil al calor de *E. coli* 'LT') tales como una CT con una sustitución en Glu-29 [49], etc., los vehículos preferidos son el toxoide diftérico, el toxoide tetánico, la proteína D de *H. influenzae* y particularmente CRM<sub>197</sub>.

Dentro de una composición de la invención es posible usar más de una proteína portadora, por ejemplo, para reducir el riesgo de la supresión de vehículo. Por tanto, pueden usarse diferentes proteínas portadoras para diferentes serogrupos, por ejemplo, los sacáridos del serogrupo A podrían conjugarse con CRM<sub>197</sub>, mientras que los sacáridos del serogrupo C podrían conjugarse con toxoide tetánico. También es posible usar más de una proteína portadora

para un antígeno de sacárido particular, por ejemplo, los sacáridos del serogrupo A podrían estar en dos grupos, con algunos conjugados con CRM<sub>197</sub> y otros conjugados con toxoide el tetánico. Sin embargo, en general se prefiere usar la misma proteína portadora para todos los serogrupos, siendo CRM<sub>197</sub> la elección preferida.

5 Una única proteína portadora podría llevar más de un antígeno de sacárido [50]. Por ejemplo, una única proteína portadora podría haberse conjugado con sacáridos de los serogrupos A y C. Para lograr este objetivo, los sacáridos pueden mezclarse antes de la reacción de conjugación. Sin embargo, en general se prefiere tener conjugados separados para cada serogrupo.

10 Se prefieren conjugados con una relación de sacárido:proteína (peso/peso) de entre 1:5 (es decir, proteína en exceso) y 5:1 (es decir, sacárido en exceso). Se prefieren relaciones entre 1:2 y 5:1 ya que las relaciones entre 1:1,25 y 1:2,5 son más preferidas. Puede preferirse la proteína portadora en exceso para MenA y MenC.

Los conjugados pueden usarse conjuntamente con proteína portadora libre [51]. Cuando una proteína portadora dada está presente en forma tanto libre como conjugada en una composición de la invención, la forma sin conjugar es preferentemente no más del 5% de la cantidad total de la proteína portadora en la composición como un todo, y más preferentemente está presente a menos del 2% en peso.

15 Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier conector adecuado si fuera necesario.

El sacárido se activará o funcionalizará normalmente antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos de cianilación tales como CDAP (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio [52, 53, etc.]). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norbornano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 27).

20 Los enlaces mediante un grupo conector pueden hacerse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 54 y 55. Un tipo de enlace implica aminación reductora del polisacárido, acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo de enlace de ácido adípico y luego acoplamiento de una proteína al otro extremo del grupo de enlace de ácido adípico [25, 56, 57]. Otros conectores incluyen B-propionamido [58], nitrofenil-etilamina [59], haluro de haloacilos [60], enlaces glucosídicos [61], ácido 6-aminocaproico [62], ADH [63], restos C<sub>4</sub> a C<sub>12</sub> [64], etc. Como alternativa al uso de un conector puede usarse el enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender la oxidación del polisacárido seguido de la aminación reductora con la proteína, como se describe en, por ejemplo, las referencias 65 y 66.

30 Se prefiere un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, reemplazando grupos =O terminales con -NH<sub>2</sub>) seguido de derivatización con un diéster adípico (por ejemplo, N-hidroxisuccinimidodiestéer de ácido adípico) y reacción con proteína portadora. Otra reacción preferida usa la activación de CDAP con un vehículo de proteína D, por ejemplo, para MenA o MenC.

Después de la conjugación pueden separarse los sacáridos libres y conjugados. Hay muchos procedimientos adecuados que incluyen cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [véanse también las refs. 67 y 68, etc.].

35 Si la composición de la invención incluye un oligosacárido conjugado, se prefiere que la preparación del oligosacárido preceda a la conjugación.

Después de la conjugación, los procedimientos de la invención pueden incluir una etapa de medir el nivel de proteína portadora sin conjugar. Una forma de hacer esta medición implica electroforesis capilar [69] (por ejemplo, en disolución libre), o cromatografía electrocinética micelar [70].

40 Después de la conjugación, los procedimientos de la invención pueden incluir una etapa de medir el nivel de sacárido sin conjugar. Una forma de hacer esta medición implica HPAEC-PAD [67].

45 Después de la conjugación, los procedimientos de la invención pueden incluir una etapa de separar el sacárido conjugado del sacárido sin conjugar. Una forma de separar estos sacáridos es usar un procedimiento que precipite selectivamente un componente. Se prefiere la precipitación selectiva de sacárido conjugado para dejar sacárido sin conjugar en disolución, por ejemplo, mediante un tratamiento con desoxicolato [67].

Después de la conjugación, los procedimientos de la invención pueden incluir una etapa de medir el tamaño molecular y/o la masa molar de un conjugado. En particular pueden medirse distribuciones. Una forma de hacer estas mediciones implica cromatografía de exclusión por tamaño con detección por fotometría de dispersión de la luz multiángulo y refractometría diferencial (SEC-MALS/RI) [71].

## 50 **Oligosacáridos**

Los sacáridos capsulares se usarán generalmente en forma de oligosacáridos. Éstos se forman convenientemente por fragmentación de polisacárido capsular purificado (por ejemplo, mediante hidrólisis), que normalmente irá seguido de purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

La fragmentación de polisacáridos se realiza preferentemente dando un grado de polimerización (GP) promedio final en el oligosacárido de menos de 30 (por ejemplo, entre 10 y 20, preferentemente aproximadamente 10 para el serogrupo A; entre 15 y 25 para los serogrupos W 135 e Y, preferentemente aproximadamente 15-20; entre 12 y 22 para el serogrupo C; etc.). EL GP puede medirse convenientemente por cromatografía de intercambio iónico o por ensayos colorimétricos [72].

Si se realiza la hidrólisis, el hidrolizado se dimensionará generalmente con el fin de eliminar oligosacáridos de longitud corta [73]. Esto puede lograrse de diversas formas tales como ultrafiltración seguida de cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización inferior a o igual a aproximadamente 6 se eliminan preferentemente para el serogrupo A, y aquellos de menos de aproximadamente 4 se eliminan preferentemente para los serogrupos W 135 e Y.

La hidrólisis química de sacáridos implica generalmente tratamiento con tanto ácido como base en condiciones que son estándar en la materia. Las condiciones para la despolimerización de sacáridos capsulares en sus monosacáridos constituyentes se conocen en la técnica. Un procedimiento de despolimerización implica el uso de peróxido de hidrógeno [11]. El peróxido de hidrógeno se añade a un sacárido (por ejemplo, dando una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> final del 1%), y luego se incuba la mezcla (por ejemplo, a aproximadamente 55°C) hasta que se haya alcanzado un reducción de longitud de cadena deseada. La reducción con el tiempo puede ir seguida de la toma de muestras de la mezcla y luego de la medición del tamaño molecular (promedio) del sacárido en la muestra. La despolimerización puede luego detenerse mediante enfriamiento rápido una vez se haya alcanzado una longitud de cadena deseada.

### **Serogrupo B**

Las vacunas contra patógenos tales como el virus de la hepatitis B, la difteria y el tétanos normalmente contienen un único antígeno de proteína (por ejemplo, el antígeno de superficie del VHB o un toxoide tetánico). A diferencia, la vacunas contra la tos ferina acelular normalmente contienen al menos tres proteínas de *B. pertussis* y la vacuna pneumocócica PreVNar™ contiene siete antígenos de sacáridos conjugado separados. Otras vacunas tales como las vacunas de pertussis celular, la vacuna contra el sarampión, la vacuna contra la poliomielitis inactivada (IPV) y las vacunas OMV meningocócicas son por su propia naturaleza mezclas complejas de un gran número de antígenos. Tanto si la protección puede provocarse o no por un único antígeno, un número pequeño de antígenos definidos, o una mezcla compleja de antígenos sin definir, depende, por tanto, del patógeno en cuestión.

Como se menciona anteriormente, una vacuna contra el meningococo del serogrupo B ha demostrado ser evasiva. Las vacunas basadas en OMV muestran una estrecha eficacia. Además, el gran número de antígenos sin definir presentes en una OMV, combinado con su naturaleza variable, significa que las OMV tienen diversos problemas de control de calidad. Los inventores han encontrado que puede lograrse la amplia protección contra la infección por el serogrupo B, y que esto puede lograrse usando un número pequeño de antígenos de polipéptidos del serogrupo B definidos y, por tanto, las composiciones de la invención incluyen uno o más antígenos de polipéptidos de forma que la composición pueda inducir una respuesta inmunitaria que es bactericida contra dos o más (es decir, 2 ó 3) de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y el linaje 3 del serogrupo B de *N. meningitidis*.

Se ha informado de secuencias del genoma para serogrupos A [74] y B [75,76] meningocócicos y pueden seleccionarse antígenos adecuados de los polipéptidos codificados [por ejemplo, refs. 77-82]. Los antígenos candidatos se han manipulado para mejorar la expresión heteróloga [refs. 83 a 85].

Una composición preferida incluye una proteína Tbp y una proteína Hsf [86]. Hsf es una proteína autotransportadora [87-89] también conocida como nhhA [89], GNA0992 [77] o NMB0992 [75]. Tbp es una proteína de unión a transferrina [90-93] y engloba tanto TbpA como TbpB y las formas de alto peso molecular y bajo peso molecular de TbpA y TbpB. Tbp engloba las proteínas individuales descritas anteriormente y complejos de las proteínas y cualquier otra proteína o complejo de la misma que pueda unirse a transferrina. Aunque la Tbp puede referirse tanto a las formas de alto como de bajo peso molecular de TbpA o TbpB, se prefiere que estén presentes ambas formas de alto peso molecular y bajo peso molecular de TbpA y/o TbpB. Lo más preferentemente está presente TbpA de alto peso molecular y de bajo peso molecular.

Otra composición preferida incluye el lipooligosacárido del serogrupo B (LOS) [94]. El LOS puede usarse además de el (los) polipéptido(s) del serogrupo B o puede usarse en lugar de él/ellos.

Otra composición preferida incluye al menos un antígeno seleccionado de cada una de las al menos dos categorías diferentes de proteínas que tienen diferentes funciones dentro de *Neisseria*. Ejemplos de tales categorías de proteínas son: adhesinas, proteínas autotransportadoras, toxinas, proteínas de membrana externa integrales y proteínas de adquisición de hierro. Estos antígenos pueden seleccionarse del siguiente modo usando la nomenclatura de la referencia 95: al menos una adhesina de *Neisseria* seleccionada del grupo que consiste en FhaB, NspA PiiC, Hsf, Hap, MafA, MafB, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB 1119 y NadA; al menos un autotransportador de *Neisseria* seleccionado del grupo que consiste en Hsf, Hap, proteasa IgA, AspAy NadA; al menos una toxina de *Neisseria* seleccionada del grupo que consiste en FrpA, FrpC, FrpA/C, VapD, NM-ADPRT (NMB 1343) y uno o ambos de LPS inmunotipo L2 y LPS inmunotipo L3; al menos una proteína de adquisición de Fe



de *Neisseria* seleccionada del grupo que consiste en TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB, Lipo28 (GNA2132), Sibp, NMB0964, NMB0293, FbpA, Bcp, BfrA, BfrB y P2086 (XthA); al menos una proteína asociada a la membrana de *Neisseria*, preferentemente proteína de membrana externa, particularmente proteína de membrana externa integral, seleccionada del grupo que consiste en PilQ, OMP85, FhaC, NspA, TbpA, LbpA, TspA, TspB, TdfH, PorB, MltA, HpuB, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA (GNA1946), NMB1124, NMB 1162, NMB1220, NMB1313, NMB 1953, HtrA y PLDA (OMPLA). Se dice que estas combinaciones de antígenos de *Neisseria* conducen a un sorprendente potenciamiento de la eficacia de la vacuna contra infección por *Neisseria* [95]. Composiciones particularmente preferidas incluyen uno o más de los cinco siguientes antígenos [96]: (1) una proteína 'NadA', preferentemente en forma oligomérica (por ejemplo, en forma trimérica); (2) una proteína '741'; (3) una proteína '936'; (4) una proteína '953'; y (5) una proteína '287'.

'NadA' (adhesina A de *Neisseria*) de MenB se desvela como la proteína '961' en la referencia 80 (SEC ID 2943 y 2944) y como 'NMB1994' en la referencia 75 (véanse también los números de acceso de GenBank: 11352904 y 7227256). Un estudio detallado de la proteína puede encontrarse en la referencia 97. Si se usa según la presente invención, NadA puede tomar diversas formas. Formas preferidas de NadA son variantes de truncación o de delección tales como las desveladas en las referencias 83 a 85. En particular, NadA se prefiere sin su ancla de membrana del extremo C (por ejemplo, delección de residuos 351-405 para la cepa 2996 dando SEC ID NO:1 en el presente documento), que algunas veces se distingue en el presente documento por el uso de un superíndice 'C', por ejemplo, NadA<sup>(C)</sup>. La expresión de NadA sin su dominio de ancla de membrana en *E. coli* produce la secreción de la proteína en el sobrenadante de cultivo con eliminación concomitante de su péptido conductor 23mero (por ejemplo, para dejar un 327mero para la cepa 2996 [SEC ID N°:2 en el presente documento]). Los polipéptidos sin sus péptidos conductores se distinguen algunas veces en el presente documento por el uso de un superíndice 'NL', por ejemplo, NadA<sup>(NL)</sup> o NadA<sup>(C)(NL)</sup>. Los polipéptidos NadA preferidos tienen una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene el 50% o más de identidad (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con la SEC ID N°:2; y/o (b) comprenden un fragmento de al menos *n* aminoácidos consecutivos de SEC ID N°:1, en la que *n* es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos para (b) carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o del extremo N de SEC ID N°:1 (por ejemplo, NadA<sup>(C)</sup>, NadA<sup>(NL)</sup>, NadA<sup>(C)(NL)</sup>). Otros fragmentos preferidos comprenden un epítipo de SEQ ID 1, y un fragmento particularmente preferido de SEC ID 1 es SEC ID 2. Estas diversas secuencias incluye variantes de NadA (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Se muestran diversas secuencias de NadA en la Figura 9 de la referencia 98.

La proteína '741' de MenB se desvela en la referencia 80 (SEC ID 2535 y 2536) y como 'NMB1870' en la referencia 75 (véase también el número de acceso de GenBank G1:7227128). La proteína correspondiente en el serogrupo A [74] tiene un número de acceso de GenBank 7379322. 741 es naturalmente una lipoproteína. Si se usa según la presente invención, la proteína 741 puede tomar diversas formas. Formas preferidas de 741 son variantes de truncación o de delección tales como las desveladas en las referencias 83 a 85. En particular, el extremo N de 741 puede deleccionarse hasta e incluir su secuencia de poli-glicina (es decir, delección de residuos 1 a 72 para la cepa MC58 [SEC ID N°:3 en el presente documento]), que se distingue algunas veces en el presente documento por el uso de un prefijo 'ΔG'. Esta delección puede potenciar la expresión. La delección también elimina el sitio de lipidación de 741. Las secuencias de 741 preferidas tienen una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene el 50% o más de identidad (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con SEC ID N°:3; y/o (b) comprende un fragmento de al menos *n* aminoácidos consecutivos de SEC ID N°:3 en la que *n* es 7 o más (por ejemplo, 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 741. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o del extremo N de SEC ID N°:3. Estas secuencias incluyen 741 variantes (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Pueden encontrarse diversas secuencias de 741 en SEC ID 1 a 22 de la referencia 85, en SEC ID 1 a 23 de la referencia 99 y en SEC ID 1-299 de la referencia 100.

La proteína '936' del serogrupo B se desvela en la referencia 80 (SEC ID 2883 y 2884) y como 'NMB2091' en la referencia 75 (véase también el número de acceso de GenBank G1:7227353). El gen correspondiente en el serogrupo A [74] tiene el número de acceso de GenBank 7379093. Si se usa según la presente invención, la proteína 936 puede tomar diversas formas. Formas preferidas de 936 son variantes de truncación o de delección tales como las desveladas en las referencias 83 a 85. En particular, el péptido conductor del extremo N de 936 puede estar deleccionado (por ejemplo, delección de los residuos 1 a 23 para la cepa MC58 dando 936<sup>(NL)</sup> [SEC ID N°:4 en el presente documento]). Las secuencias de 936 preferidas tienen una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene el 50% o más de identidad (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con SEC ID N°:4; y/o (b) comprende un fragmento de al menos *n* aminoácidos consecutivos de SEC ID N°:4 en la que *n* es 7 o más (por ejemplo, 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 936. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o del extremo N de SEC ID N°:4. Estas secuencias incluyen variantes de 936 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.).

La proteína '953' del serogrupo B se desvela en la referencia 80 (SEC ID 2917 y 2918) y como 'NMB1030' en la referencia 75 (véase también el número de acceso de GenBank G1:7226269). La proteína correspondiente en el

serogrupo A [74] tiene el número de acceso de GenBank 7380108. Si se usa según la presente invención, la proteína 953 puede tomar diversas formas. Formas preferidas de 953 son variantes de truncación o de delección tales como las desveladas en las referencias 83 a 85. En particular, el péptido conductor del extremo N de 953 puede estar delecionado (por ejemplo, delección de los residuos 1 a 19 para la cepa MC58 dando 953<sup>NL</sup>) [SEC ID N°:5 en el presente documento]. Las secuencias de 953 preferidas tienen una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene el 50% o más de identidad (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con SEC ID N°:5; y/o (b) comprende un fragmento de al menos  $n$  aminoácidos consecutivos de SEC ID N°:5 en la que  $n$  es 7 o más (por ejemplo, 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 953. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o del extremo N de SEC ID N°:5. Estas secuencias incluyen variantes de 936 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Las formas alélicas de 953 pueden verse en la Figura 19 de la referencia 82.

La proteína '287' del serogrupo B se desvela en la referencia 80 (SEC ID 3103 y 3104), como 'NMB2132' en la referencia 75 y como 'GNA2132' en la referencia 77 (véase también el número de acceso de GenBank GI:7227388). La proteína correspondiente en el serogrupo A [74] tiene el número de acceso de GenBank 7379057. Si se usa según la presente invención, la proteína 287 puede tomar diversas formas. Formas preferidas de 287 son variantes de truncación o de delección tales como las desveladas en las referencias 83 a 85. En particular, el extremo N de 287 puede deleccionarse hasta e incluir su secuencia de poli-glicina (por ejemplo, delección de residuos 1 a 24 para la cepa MC58 dando  $\Delta$ G287 [SEC ID N°:6 en el presente documento]). Esta delección puede potenciar la expresión. Secuencias de 287 preferidas tienen una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene el 50% o más de identidad (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con SEC ID N°:6; y/o (b) comprende un fragmento de al menos  $n$  aminoácidos consecutivos de SEC ID N°:6 en la que  $n$  es 7 o más (por ejemplo, 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 287. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C y/o del extremo N de SEC ID N°:6. Estas secuencias incluyen 287 variantes (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Las formas alélicas de 287 pueden verse en las Figuras 5 y 15 de la referencia 82, y en el Ejemplo 13 y la Figura 21 de la referencia 80 (SEC ID 3179 a 3184).

Los antígenos de MenB preferidos comprenden una secuencia de aminoácidos encontrada en una de las cepas 2996, MC58, 95N477 y 394/98. La proteína 287 es preferentemente de la cepa 2996, o más preferentemente de la cepa 394/98. La proteína 741 es preferentemente de las cepas MC58, 2996, 394/98 ó 95N477 del serogrupo B, o de la cepa 90/18311 del serogrupo C. La cepa MC58 es más preferida. Las proteínas 936, 953 y NadA son preferentemente de la cepa 2996. Si una composición incluye un antígeno de proteína particular (por ejemplo, 741 ó 287), la composición puede incluir ese antígeno en más de una forma variante, por ejemplo, la misma proteína, pero de más de una cepa. Estas proteínas pueden incluirse como proteínas en tándem o separadas.

Sin embargo, en algunas realizaciones, la composición de la invención incluye la misma proteína, pero de más de una cepa. Se ha encontrado que esta solución es eficaz con la proteína 741. Esta proteína es un antígeno extremadamente eficaz para provocar respuestas de anticuerpos antimeningocócicos y se expresa a través de todos los serogrupos meningocócicos. El análisis filogenético muestra que la proteína se divide en dos grupos, y que uno de éstos se divide de nuevo dando tres variantes en total [101] y, mientras que el suero producido contra una variante dada es bactericida dentro del mismo grupo de variante, no es activo contra cepas que expresan una de las otras dos variantes, es decir, hay protección cruzada intra-variante, pero no protección cruzada inter-variante [99, 101]. Por tanto, para la máxima eficacia de cepas cruzadas se prefiere que una composición incluya más de una variante de proteína 741. Una secuencia a modo de ejemplo de cada variante se facilita en SEC ID N°: 10, 11 y 12 en el presente documento, empezando con un residuo de cisteína del extremo N al que el lípido se unirá covalentemente en la forma de lipoproteína nativa. Por tanto, se prefiere que la composición pueda incluir al menos dos de: (1) una primera proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el  $a\%$  de identidad de secuencias con SEC ID N°:10 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos  $x$  aminoácidos contiguos de SEC ID N°:10; (2) una segunda proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos el  $b\%$  de identidad de secuencias con SEC ID N°: 11 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos  $y$  aminoácidos contiguos de SEC ID N°:11; y (3) una tercera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos el  $c\%$  de identidad de secuencias con SEC ID N°:12 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un fragmento de al menos  $z$  aminoácidos contiguos de SEC ID N°: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 dada no se encuentre en más de una de las categorías (1), (2) y (3). Por tanto,

5 cualquier secuencia de 741 dada se encontrará en sólo una de las categorías (1), (2) y (3). Por tanto, se prefiere que: la proteína (1) tenga menos del  $i\%$  de identidad de secuencias con la proteína (2); la proteína (1) tenga menos del  $j\%$  de identidad de secuencias con la proteína (3); y la proteína (2) tenga menos del  $k\%$  de identidad de secuencias con la proteína (3). El valor de  $i$  es 60 o más (por ejemplo, 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 como máximo es  $a$ . El valor de  $j$  es 60 o más (por ejemplo, 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 como máximo es  $b$ . El valor de  $k$  es 60 o más (por ejemplo, 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 como máximo es  $c$ . Los valores de  $i$ ,  $j$  y  $k$  no están intrínsecamente relacionados entre sí.

10 La composiciones de la invención incluyen un pequeño número (por ejemplo, inferior a  $t$  antígenos, siendo  $t$  10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 ó 3) de antígenos del serogrupo B purificados. Es particularmente preferido que la composición no pueda incluir mezclas complejas o sin definir de antígenos, por ejemplo, se prefiere que en la composición no se incluyan vesículas de la membrana externa. Los antígenos se expresan preferentemente recombinantemente en un huésped heterólogo y luego se purifican. Para una composición que incluye  $t$  antígenos de MenB pueden ser  $t$  polipéptidos separados pero, para reducir incluso más la complejidad, se prefiere que al menos dos de los antígenos se expresen como una única cadena de polipéptidos (una proteína 'híbrida' [refs. 83 a 85]), es decir, de forma que los  $t$  antígenos formen menos de  $t$  polipéptidos. Las proteínas híbridas ofrecen dos ventajas principales: primero, una proteína que puede ser inestable o expresarse mal por sí misma puede ayudarse añadiéndole un componente híbrido adecuado que venza el problema; segundo, la fabricación comercial se simplifica ya que sólo necesita emplearse una expresión y purificación con el fin de producir dos proteínas separadamente útiles. Una proteína híbrida incluida en una composición de la invención puede comprender dos o más (es decir, 2, 3, 4 ó 5) de los cinco antígenos enumerados anteriormente. Se prefieren híbridos que consisten en dos de los cinco antígenos.

15 Dentro de la combinación de cinco antígenos básicos (NadA, 741, 953, 936 y 287), un antígeno puede estar presente en más de una proteína híbrida y/o como una proteína no híbrida. Sin embargo, se prefiere que un antígeno esté presente tanto como un híbrido como un no híbrido, pero no como ambos, aunque puede ser útil incluir la proteína 741 tanto como un antígeno híbrido como uno no híbrido (preferentemente lipoproteína), particularmente cuando se usa más de una variante de 741.

25 Las proteínas híbridas pueden representarse por 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 conectora opcional; A es una secuencia de aminoácidos del extremo N opcional; B es una secuencia de aminoácidos del extremo C opcional; y  $n$  es 2, 3, 4 ó 5.

30 Lo más preferentemente,  $n$  es 2. Híbridos de dos antígenos para uso 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. Dos proteínas preferidas son:  $X_1$  es 936 y  $X_2$  es 741;  $X_1$  es 287 y  $X_2$  es 953.

35 Si un resto -X- tiene una secuencia de péptidos conductora en su forma natural, ésta puede incluirse u omitirse en la proteína híbrida. En algunas realizaciones, los péptidos conductores estarán delecionados, excepto el del resto -X- localizado en el extremo N de la proteína híbrida, es decir, se conservará el péptido conductor de  $X_1$ , pero se omitirán los péptidos conductores de  $X_2 \dots X_n$ . Esto es equivalente a delecionar todos los péptidos conductores y usar el péptido conductor de  $X_1$  como resto -A-.

40 Para cada caso de  $n$  de  $[\text{-X-L-}]_n$ , la secuencia conectora de aminoácidos -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, si  $n=2$  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 conectora(s) -L- serán normalmente cortas (por ejemplo, 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). Ejemplos comprenden secuencias de péptidos cortas que facilitan la clonación, conectores de poli-glicina (es decir, que comprenden  $\text{Gly}_n$  en la que  $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$  o más) y marcas de histidina (es decir,  $\text{His}_n$  en la que  $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$  o más). Otras secuencias de aminoácidos conectoras adecuadas serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Un conector útil es GSGGGG (SEC ID 9), estando el dipéptido Gly-Ser formado por un sitio de restricción *Bam*HI, ayudando así en la clonación y la manipulación, y siendo el tetrapéptido  $(\text{Gly})_4$  un conector de poli-glicina típico. Si  $X_{n+1}$  es una proteína  $\Delta\text{G}$  y  $L_n$  es un conector de glicina, esto puede ser equivalente a  $X_{n+1}$  no estando una proteína  $\Delta\text{G}$  y estando ausente  $L_n$ .

45 -A- es una secuencia de aminoácidos del extremo N opcional. Ésta será normalmente corta (por ejemplo, 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 conductoras para dirigir el tráfico de proteínas, o secuencias de péptidos cortas que facilitan la clonación o purificación (por ejemplo, marcas de histidina, es decir,  $\text{His}_n$  en la que  $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$  o más). Otras secuencias de aminoácidos del extremo N adecuadas serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Si  $X_1$  carece de su propia metionina del extremo N, -A- es preferentemente un oligopéptido (por ejemplo, con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos) que proporciona una metionina del extremo N.

55 -B- es una secuencia de aminoácidos del extremo C opcional. Ésta será normalmente corta (por ejemplo, 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 para dirigir el tráfico de proteínas, secuencias de péptidos cortas que facilitan la clonación o purificación (por ejemplo, que comprenden marcas de histidina, es decir, His<sub>n</sub> en la que n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) o secuencias que potencian la estabilidad de proteínas. Otras secuencias de aminoácidos del extremo C adecuadas serán evidentes para aquellos expertos en la materia.

Dos proteínas híbridas particularmente preferidas de la invención son del siguiente modo:

<i>n</i>	A	X <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	L <sub>2</sub>	B	SEC ID N°:
2	MA	ΔG287	GSGGGG	953 <sup>(NL)</sup>	-	-	7
2	M	936 <sup>(NL)</sup>	GSGGGG	ΔG741	-	-	8

Estas dos proteínas pueden usarse en combinación con NadA (particularmente con SEC ID N°:2). Por tanto, una composición preferida de antígenos de MenB para uso con la invención incluye un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°:2, un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°:7 y un tercer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°:8. Éste es un grupo preferido de antígenos de MenB para uso con la invención.

Como se mencionan anteriormente, las composiciones de la invención pueden inducir una respuesta de anticuerpos bactericidas del suero que es eficaz contra dos o tres de los linajes hipervirulentos de MenB A4, ET-5 y el linaje 3. Adicionalmente pueden inducir respuestas de anticuerpos bactericidas contra uno o más de los linajes hipervirulentos del subgrupo I, subgrupo III, subgrupo IV-1 o complejo ET-37, y contra otros linajes, por ejemplo, linajes hiperinvasivos. Estas respuestas de anticuerpos se miden convenientemente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de vacunas [por ejemplo, véase la nota final 14 de la referencia 77]. La actividad bactericida del suero (SBA) mide la destrucción bactericida mediada por complemento y puede ensayarse usando complemento humano o de bebé de conejo. Los patrones de la OMS requieren una vacuna para inducir al menos un aumento de 4 veces en SBA en más del 90% de los receptores.

La composición no necesita inducir anticuerpos bactericidas contra todas las cepas de MenB dentro de estos linajes hipervirulentos; más bien, para cualquier grupo dado de cuatro o más cepas de meningococo del serogrupo B dentro de un linaje hipervirulento particular, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas contra al menos el 50% (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90% o más) del grupo. Los grupos preferidos de cepas incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los siguientes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. El suero tiene preferentemente un título bactericida de al menos 1024 (por ejemplo, 2<sup>10</sup>, 2<sup>11</sup>, 2<sup>12</sup>, 2<sup>13</sup>, 2<sup>14</sup>, 2<sup>15</sup>, 2<sup>16</sup>, 2<sup>17</sup>, 2<sup>18</sup> o superior, preferentemente al menos 2<sup>14</sup>) es decir, el suero puede destruir al menos el 50% de las bacterias de prueba de una cepa particular cuando se diluye 1/1024, como se describe en la referencia 77.

Las composiciones preferidas pueden inducir respuestas bactericidas contra las siguientes cepas de meningococo del serogrupo B: (i) del conjunto A4, la cepa 961-5945 (B:2b:P1.21,16) y/o la cepa G2136 (B:-); (ii) del complejo ET-5, la cepa MC58 (B:15:PI.7,16b) y/o la cepa 44/76 (B:15:P1.7,16); (iii) del linaje 3, la cepa 394/98 (B:4:P1.4) y/o la cepa BZ198 (B:NT:-). Composiciones más preferidas pueden inducir respuestas bactericidas contra las cepas 961-5945, 44/76 y 394/98. Las cepas 961-5945 y G2136 son ambas cepas de referencia por MLST de *Neisseria* [identificaciones 638 y 1002 en la ref. 102]. La cepa MC58 está ampliamente disponible (por ejemplo, ATCC BAA-335) y fue la cepa secuenciada en la referencia 75. La cepa 44/76 se ha usado y caracterizado ampliamente (por ejemplo, la ref. 103) y es una de las cepas de referencia por MLST de *Neisseria* [identificación 237 en la ref. 102; fila 32 de la Tabla 2 en la ref. 104]. La cepa 394/98 se aisló originariamente en Nueva Zelanda en 1998 y ha habido varios estudios usando esta cepa (por ejemplo, refs. 105 y 106). La cepa BZ198 es otra cepa de referencia por MLST [identificación 409 en la ref. 102; fila 41 de la Tabla 2 en la ref. 104]. La composición puede inducir adicionalmente una respuesta bactericida contra la cepa LNP17592 del serogrupo W135 (W135:2a:P1.5,2) del complejo ET-37. Esta es una cepa Haji aislada en Francia en 2000.

Otros antígenos de polipéptidos de MenB que pueden incluirse en las composiciones de la invención incluyen aquellos que comprende una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEC ID N°:650 de la ref. 78; SEC ID N°:878 de la ref. 78; SEC ID N°:884 de la ref. 78; SEC ID N°:4 de la ref. 79; SEC ID N°:598 de la ref. 80; SEC ID N°:818 de la ref. 80; SEC ID N°:864 de la ref. 80; SEC ID N°:866 de la ref. 80; SEC ID N°:1196 de la ref. 80; SEC ID N°:1272 de la ref. 80; SEC ID N°:1274 de la ref. 80; SEC ID N°:1640 de la ref. 80; SEC ID N°:1788 de la ref. 80; SEC ID N°:2288 de la ref. 80; SEC ID N°:2466 de la ref. 80; SEC ID N°:2554 de la ref. 80; SEC ID N°:2576 de la ref. 80; SEC ID N°:2606 de la ref. 80; SEC ID N°:2608 de la ref. 80; SEC ID N°:2616 de la ref. 80; SEC ID N°:2668 de la ref. 80; SEC ID N°:2780 de la ref. 80; SEC ID N°:2932 de la ref. 80; SEC ID N°:2958 de la ref. 80; SEC ID N°:2970 de la ref. 80; SEC ID N°:2988 de la ref. 80, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene el 50% o más de identidad (por ejemplo, 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 la que  $n$  es 7 o más (por ejemplo, 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. Puede incluirse más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más) de estos polipéptidos.

## 5 Otros componentes antigénicos

Los antígenos no meningocócicos y de no *Neisseria*, preferentemente aquellos que no disminuyen la respuesta inmunitaria contra los componentes meningocócicos, también puede incluirse en composiciones de la invención. La ref. 107, por ejemplo, desvela combinaciones de oligosacáridos de los serogrupos B y C de *N. meningitidis* junto con el sacárido Hib. Antígenos no meningocócicos particularmente preferidos incluyen:

- 10 - un antígeno de la difteria tal como un toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 3 de la ref. 108].
- un antígeno del tétanos tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 4 de la ref. 108].
- holotoxina de Pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o los aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, refs. 109 y 110].
- antígeno celular de pertussis.
- 15 - un antígeno del virus de la hepatitis A tal como virus inactivado [por ejemplo, 111, 112].
- un antígeno del virus de la hepatitis B tal como antígenos de superficie y/o de núcleo [por ejemplo, 112,113], estando el antígeno de superficie preferentemente adsorbido sobre un fosfato de aluminio [114].
- antígeno(s) de la poliomielititis [por ejemplo, 115, 116] tal como IPV.

La mezcla puede comprender uno o más de estos otros antígenos que pueden estar desintoxicados si fuera necesario (por ejemplo, desintoxicación de la toxina de pertussis por medios químicos y/o genéticos).

Si un antígeno de la difteria está incluido en la mezcla también se prefiere incluir antígeno del tétanos y antígenos de pertussis. Similarmente, si un antígeno del tétanos está incluido también se prefiere incluir antígenos de la difteria y de pertussis. Similarmente, si un antígeno de pertussis está incluido también se prefiere incluir antígenos de la difteria y del tétanos.

25 Los antígenos en la mezcla estarán normalmente 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 de sacáridos individuales no se elimine combinándolos, aunque pueda reducirse la inmunogenicidad real (por ejemplo, títulos de ELISA).

30 Como una alternativa al uso de antígenos de proteínas en la mezcla puede usarse ácido nucleico que codifica el antígeno. Por tanto, los componentes de proteína de la mezcla pueden sustituirse por ácido nucleico (preferentemente ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifica la proteína. Similarmente, las composiciones de la invención pueden comprender proteínas que imitan a los antígenos de sacáridos, por ejemplo, mimótopos [117] o anticuerpos antiidiotípicos. Éstos pueden sustituir componentes de sacáridos individuales o pueden complementarlos. Como ejemplo, la vacuna puede comprender un mimético de péptido del polisacárido capsular de MenC [118] o MenA [119] en lugar del propio sacárido.

35 Un antígeno no meningocócico que se incluye en composiciones de la invención es uno que protege contra *H. influenzae* de tipo b (Hib). Un antígeno no meningocócico preferido para la inclusión adicional en composiciones de la invención es uno que protege contra *Streptococcus pneumoniae*.

### *H. influenzae* de tipo b (Hib)

40 La composición incluye un antígeno de *H. influenzae* de tipo b, específicamente un antígeno de sacárido capsular de Hib conjugado. Los antígenos de sacáridos de *H. influenzae* b son muy conocidos.

Ventajosamente, el sacárido de Hib está covalentemente conjugado con una proteína portadora con el fin de potenciar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados de polisacárido en general, y del polisacárido capsular de Hib en particular, está muy bien documentada [por ejemplo, las referencias 21-29, etc.].  
45 La invención puede usar cualquier conjugado de Hib adecuado. Proteínas portadoras adecuadas se describen anteriormente, y los vehículos preferidos para sacáridos de Hib son CRM<sub>197</sub> ('HbOC'), toxoide tetánico ('PRP-T') y el complejo de membrana externa de *N. meningitidis* ('PRP-OMP').

50 El resto de sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo, fosfato de polirribosilribitol de longitud completa (PRP)), pero se prefiere hidrolizar polisacáridos para formar oligosacáridos (por ejemplo, MW de -1 a -5 kDa).

Un conjugado preferido comprende un oligosacárido de Hib ligado covalentemente a CRM<sub>197</sub> mediante un conector de ácido adípico [120, 121]. El toxoide tetánico también es un vehículo preferido.

La administración del antígeno de Hib produce preferentemente una concentración de anticuerpo anti-PRP de  $\geq 0,15$  µg/ml, y más preferentemente  $\geq 1$  µg/ml.

Con el antígeno de sacárido de Hib en la composición se prefiere no incluir un adyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio, entonces el antígeno de Hib puede adsorberse al adyuvante [122] o puede ser no adsorbido [123]. La prevención de la adsorción puede lograrse seleccionando el pH correcto durante el mezclado de antígeno/adyuvante, un adyuvante con un punto apropiado de carga cero y un orden apropiado de mezcla para los diversos antígenos diferentes en una composición [124].

Las composiciones de la invención pueden comprender más de un antígeno de Hib. Los antígenos de Hib pueden liofilizarse, por ejemplo, para reconstitución por composiciones meningocócicas de la invención.

#### *Streptococcus pneumoniae*

Si la composición incluye un antígeno de *S. pneumoniae*, normalmente será un antígeno de sacárido capsular que está preferentemente conjugado con una proteína portadora [por ejemplo, refs. 125 a 127]. 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 [128]. Por ejemplo, PrevNar™ [I] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F), estando cada sacárido individualmente conjugado con CRM<sub>197</sub> por aminación reductora, con 2 µg de cada sacárido por 0,5 ml de dosis (4 µg de serotipo 6B), y con conjugados adsorbidos sobre un adyuvante de fosfato de aluminio. Las composiciones de la invención incluyen preferentemente al menos los serotipos 6B, 14, 19F y 23F. Los conjugados pueden adsorberse sobre un fosfato de aluminio.

Como una alternativa al uso de antígenos de sacáridos de neumococos, la composición puede incluir uno o más antígenos de polipéptidos. Las secuencias del genoma para varias cepas de neumococos están disponibles [129, 130] y pueden someterse a vacunología inversa [131-134] para identificar antígenos de polipéptidos adecuados [135, 136]. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más de los siguientes antígenos: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp130, como se define en la referencia 137. La composición puede incluir más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14) de estos antígenos.

En algunas realizaciones, la composición puede incluir tanto antígenos de sacáridos como de polipéptidos de neumococos. Éstos puede usarse en mezcla simple, o el antígeno de sacárido neumocócico puede conjugarse con una proteína neumocócica. Proteínas portadoras adecuadas para tales realizaciones incluyen los antígenos enumerados en el párrafo previo [137].

Los antígenos neumocócicos pueden liofilizarse, por ejemplo, junto con antígeno de Hib.

#### **Composiciones farmacéuticas**

La composición de la invención comprenderá normalmente, además de los componentes mencionados anteriormente, uno o más 'vehículos farmacéuticamente aceptables' que incluyen cualquier vehículo que por sí mismo no induce la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición. Vehículos adecuados son normalmente macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa [138], trehalosa [139], lactosa y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Tales vehículos son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Las vacunas también pueden contener diluyentes tales como agua, solución salina, glicerina, etc. Adicionalmente pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento de pH y similares. La solución salina fisiológica tamponada con fosfato estéril libre de pirógenos es un vehículo típico. Una discusión meticulosa de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 140.

Las composiciones de la invención están en forma acuosa, es decir, disoluciones o suspensiones. La formulación líquida de este tipo permite que las composiciones se administren directamente a partir de su forma envasada sin la necesidad de reconstitución en un medio acuoso y son, por tanto, ideales para inyección. Las composiciones pueden presentarse en viales, o pueden presentarse en jeringuillas ya llenas. Las jeringuillas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringuilla incluirá una dosis única de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis única o dosis múltiples.

Las composiciones líquidas de la invención también son adecuadas para reconstituir otras vacunas de una forma liofilizada, para reconstituir antígenos de Hib o DTP liofilizados. Si una composición de la invención va a usarse para tal reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit que puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringuilla ya llena y un vial, usándose el contenido de la jeringuilla para reactivar el contenido del vial antes de la inyección.

Las composiciones de la invención pueden envasarse en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiples. Para formas de dosis múltiples se prefieren los viales a las jeringuillas previamente llenas. Pueden establecerse rutinariamente volúmenes de dosificación eficaces, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

El pH de la composición está preferentemente entre 6 y 8, preferentemente aproximadamente 7. El pH estable

puede mantenerse mediante el uso de un tampón. Si una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón de histidina [141]. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

5 Las composiciones de la invención son inmunogénicas y son más preferentemente composiciones de vacuna. Las vacunas según la invención pueden ser tanto profilácticas (es decir, para evitar la infección) como terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero normalmente serán profilácticas. Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno(s), además de cualquier otro componente, según se necesite. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz' se indica que la administración de esa cantidad a un individuo, tanto en una dosis única como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la  
10 prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y la condición física del individuo que va a tratarse, edad, el grupo taxonómico del individuo que va a tratarse (por ejemplo, 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 práctico de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre en un intervalo relativamente ancho que pueda determinarse por ensayos rutinarios.

15 Dentro de cada dosis, la cantidad de un antígeno de sacárido individual estará generalmente entre 1-50  $\mu\text{g}$  (medido como una masa de sacárido), por ejemplo, aproximadamente 1  $\mu\text{g}$ , aproximadamente 2,5  $\mu\text{g}$ , aproximadamente 4  $\mu\text{g}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  o aproximadamente 10  $\mu\text{g}$ .

Cada sacárido puede estar presente a sustancialmente la misma cantidad por dosis. Sin embargo, la relación (peso/peso) de sacárido de MenY:sacárido de MenW135 puede ser superior a 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o superior) y/o la relación (peso/peso) de sacárido de MenY:sacárido de MenC puede ser inferior a 1 (por ejemplo, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, o inferior).

20 Relaciones preferidas (peso/peso) para 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. Relaciones preferidas (peso/peso) para 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.

25 Composiciones preferidas de la invención comprenden menos de 50  $\mu\text{g}$  de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden  $\leq 40$   $\mu\text{g}$  de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden  $\leq 30$   $\mu\text{g}$  de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden  $\leq 25$   $\mu\text{g}$  de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden  $\leq 20$   $\mu\text{g}$  de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden  $\leq 10$   $\mu\text{g}$  de sacárido meningocócico por dosis pero, idealmente, las composiciones de la invención comprenden al menos 10  $\mu\text{g}$  de sacárido meningocócico total por dosis.

Las composiciones de la invención pueden incluir un agente antimicrobiano, particularmente cuando se envasa en forma de dosis múltiples.

35 Las composiciones de la invención pueden comprender detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato) tal como Tween 80. Los detergentes están generalmente presentes a bajos niveles, por ejemplo,  $<0,01\%$ .

Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro sódico) para dar tonicidad. Es típica una concentración de  $10+2$  mg/ml de NaCl.

Las composiciones de la invención incluirán generalmente un tampón. Es típico tampón fosfato.

40 Las composiciones de la invención se administrarán generalmente conjuntamente con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones incluirán normalmente uno o más adyuvantes. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a:

#### A. Composiciones que contienen minerales

45 Las composiciones que contienen minerales adecuadas para uso 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 (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de la ref. 142], o mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose con adsorción. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [143].

#### B. Emulsiones de aceite

50 Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua tales como MF59 [Capítulo 10 de la ref. 142; véase también la ref. 144] (escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5%, formulado en partículas submicrométricas usando una microfluidizador). También puede usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la ref. 142]

Las formulaciones de saponina también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esteroles y triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso las flores de una amplia gama de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado exhaustivamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente a partir de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas tales como QS21, además de formulaciones de lípidos tales como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™.

5 Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la ref. 145. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroles, tal como colesterol [146].

15 Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la ref. 142]. Los ISCOM también incluyen normalmente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las refs. 146-148. Opcionalmente, los ISCOM pueden carecer de detergente adicional [149].

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponinas puede encontrarse en las refs. 150 y 151.

D. Virosomas y partículas similares a virus

20 Los virosomas y las partículas similares a virus (VLP) también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patógenas, no replicantes y generalmente no contienen ninguno de los genomas víricos nativos. Las proteínas víricas pueden producirse recombinantemente o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tal como HA o NA), virus de la hepatitis B (tal como proteínas de núcleo o de cápside), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la glosopeda, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Qβ (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Los VLP se tratan adicionalmente en las refs. 152-157. Los virosomas se tratan adicionalmente en, por ejemplo, la ref. 158.

E. Derivados bacterianos o microbianos

30 Los adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas.

35 Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se desvela en la ref. 159. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 μm [159]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A tales como derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, por ejemplo, RC-529 [160, 161].

40 Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en las refs. 162 y 163.

45 Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina sin metilar ligada por un enlace fosfato a una guanina). También se ha mostrado que los ARN bicatenarios y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) son inmunoestimuladores.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 164, 165 y 166 desvelan posibles sustituciones análogas, por ejemplo, sustitución de guanina con 2'-desoxi-7-deazaguanina. El efecto adyuvante de oligonucleótidos de CpG se trata adicionalmente en las refs. 167-172.

50 La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [173]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1 tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B tal como ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se tratan en las refs. 174-176. Preferentemente, el CpG es el ODN CpG-A.

Preferentemente, el oligonucleótido de CpG se construye de manera que el extremo 5' esté accesible para el



reconocimiento de receptores. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos de CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las refs. 173 y 177-179.

5 Las toxinas ribosilantes de ADP bacterianas y los derivados desintoxicados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (enterotoxina lábil al calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o Pertussis ("PT"). El uso de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adyuvantes de la mucosa se describe en la ref. 180 y como adyuvantes parenterales en la ref. 181. La toxina o el toxoide están preferentemente en forma de una holotoxina que comprende tanto subunidades A como B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación desintoxicante; preferentemente la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de 10 toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las refs. 182-189. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas ribosilantes de ADP expuestas en la ref. 190.

#### F. Inmunomoduladores humanos

15 Los inmunomoduladores humanos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [191], etc.) [192], interferones (por ejemplo, interferón  $\gamma$ ), factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral.

#### G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

20 También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas [193] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención [194].

#### H. Micropartículas

25 Las micropartículas también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150  $\mu$ m de diámetro, más preferentemente ~200 nm a ~30  $\mu$ m de diámetro, y lo más preferentemente ~500 nm a ~10  $\mu$ m de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliorioéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para tener una superficie negativamente cargada (por ejemplo, con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo, con un detergente catiónico 30 tal como CTAB).

#### I. Liposomas (capítulos 13 y 14 de la ref. 142)

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes se describen en las refs. 195-197.

#### J. Formulaciones de polioxietilenéteres y polioxietilenésteres

35 Los adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen polioxietilenéteres y polioxietilenésteres [198]. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitano en combinación con un octoxinol [199], además de tensioactivos de polioxietilenalquiléter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [200]. Los polioxietilenéteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoriléter, polioxietilen-8-esteoriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter y polioxietilen-23-lauriléter.

#### K. Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en las refs. 201 y 202.

#### L. Muramilpéptidos

45 Ejemplos de muramilpéptidos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE).

#### M. Compuestos de imidazoquinolona

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen imiquimod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descrito adicionalmente en las refs. 203 y 204.

50 La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvante pueden usarse en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [205]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no

tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [206]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un estero) [207]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [208]; (6) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80™ al 0,4%, polímero de bloque de Pluronic al 5% L121 y thr-MDP, tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como agitado con vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula; (7) sistema de adyuvante Ribit™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que está constituido por monofosforil lípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado de LPS no tóxico (tal como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan de agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 142.

Se prefiere particularmente el uso de adyuvantes de sales de aluminio, y los antígenos se adsorben generalmente a tales sales. Los conjugados de MenC Menjugate™ y NeisVac™ usan un adyuvante de hidróxido, mientras que Meningitec™ usa un fosfato. En composiciones de la invención es posible adsorber algunos antígenos a un hidróxido de aluminio pero para tener otros antígenos en asociación con un fosfato de aluminio. Sin embargo, en general, sólo se prefiere usar una única sal, por ejemplo, un hidróxido o un fosfato, pero no ambos. El hidróxido de aluminio se evita preferentemente como adyuvante, particularmente si la composición incluye un antígeno de Hib. Por tanto, se prefieren composiciones que no contienen hidróxido de aluminio. Más bien pueden usarse fosfatos de aluminio, y un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con la relación molar de PO<sub>4</sub>/Al entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de Al<sup>3+</sup>/ml. Puede usarse la adsorción con una baja dosis de fosfato de aluminio, por ejemplo, entre 50 y 100 µg de Al<sup>3+</sup> por conjugado por dosis. Si se usa un fosfato de aluminio y se desea que no se adsorba un antígeno al adyuvante, esto se favorece incluyendo iones fosfato libres en disolución (por ejemplo, usando un tampón fosfato).

No todos los conjugados necesitan ser adsorbidos, es decir, algunos o todos pueden estar libres en disolución.

El fosfato de calcio es otro adyuvante preferido.

#### **Procedimientos de tratamiento**

Una composición de la invención puede ser para producir una respuesta de anticuerpos en un mamífero administrando una composición farmacéutica de la invención al mamífero.

La composición puede ser para uso en un procedimiento para producir una respuesta inmunitaria en un mamífero que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de la composición de la invención. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora y preferentemente implica anticuerpos. El procedimiento puede producir una respuesta de refuerzo.

El mamífero es preferentemente un ser humano. Si la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o lactante) o un adolescente; si la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adulto. Una vacuna prevista para niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

La invención también proporciona una composición de la invención para uso como medicamento. El medicamento puede producir preferentemente una respuesta inmunitaria en un mamífero (es decir, es una composición inmunogénica) y es más preferentemente una vacuna.

La invención también proporciona el uso de una composición de la invención en la preparación de un medicamento para producir una respuesta inmunitaria en un mamífero.

Estos usos y procedimientos son preferentemente para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad producida por una *Neisseria* (por ejemplo, meningitis, septicemia, bacteremia, gonorrea, etc.). Se prefiere la prevención y/o el tratamiento de meningitis bacteriana y/o meningocócica.

Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección por *Neisseria* después de la administración de la composición de la invención. Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar respuestas inmunitarias contra los cinco antígenos básicos después de la administración de la composición. La inmunogenicidad de composiciones de la invención puede determinarse administrándolas para probar sujetos (por ejemplo, niños de 12-16 meses de edad, o modelos animales [209]) y luego determinando parámetros estándar que incluyen anticuerpos bactericidas del suero (SBA) y títulos de ELISA (GMT) de IgG anti-cápsula total y de alta afinidad. Estas respuestas inmunitarias se determinarán generalmente aproximadamente 4 semanas después de la administración de la composición, y en comparación con valores determinados antes de la administración de la composición. Se prefiere un aumento de SBA de al menos 4 veces u 8 veces. Si se administra más de una dosis de la composición puede hacerse más de una determinación postratamiento.

Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente que es superior al criterio para la seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Son muy conocidos los antígenos con un título de anticuerpos asociado por encima del cual un huésped se considera que está seroconvertido contra el antígeno, y tales títulos se publican por organizaciones tales como la OMS. Preferentemente más de un 80% de una muestra estadísticamente significativa de sujetos está seroconvertida, más preferentemente más de un 90%, todavía más preferentemente más de un 93%, y lo más preferentemente el 96-100%. Las composiciones de la invención se administrarán generalmente directamente a un paciente. La administración directa puede llevarse a cabo por inyección parenteral (por ejemplo, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente o al espacio intersticial de un tejido), o por administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra mucosa. Se prefiere la administración intramuscular al muslo o al brazo superior. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es 0,5 ml.

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

El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. La dosis múltiple puede usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de refuerzo de la inmunización. Un programa de dosis primaria puede ir seguido de un programa de dosis de refuerzo. El momento adecuado entre dos dosis de sensibilización (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre la sensibilización y el refuerzo, puede determinarse rutinariamente.

Las infecciones por *Neisseria* afectan diversas áreas del cuerpo y, por tanto, las composiciones de la invención pueden prepararse de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones. La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un spray. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como spray, gotas, gel o polvo [por ejemplo, las refs. 210 y 211]. Se ha informado del éxito con la administración nasal de sacáridos neumocócicos [212, 213], polipéptidos neumocócicos [214], sacáridos de Hib [215], sacáridos de MenC [216] y mezclas de conjugados de sacáridos de Hib y MenC [217].

#### **Estabilidad durante el almacenamiento**

Las composiciones de la invención ofrecen una estabilidad mejorada, particularmente para el componente de sacárido del serogrupo A. La presente solicitud desvela un procedimiento para preparar una composición de vacuna que comprende las etapas de: (1) mezclar (i) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo C, (ii) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo W135, (iii) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo Y y (iv) uno o más antígenos de polipéptidos del serogrupo B; (2) guardar la composición resultante de la etapa (1) durante al menos 1 semana; (3) preparar una jeringuilla que contiene la composición almacenada de la etapa (2) lista para inyección a un paciente; y, opcionalmente (4) inyectar la composición al paciente.

La etapa (1) también puede implicar mezclar (v) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo A. En un aspecto de la invención también implica mezclar (vi) un antígeno de sacárido capsular conjugado de Hib. También puede implicar mezclar (vii) un antígeno neumocócico. La etapa (2) implica preferentemente al menos 2 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 12 semanas o más de almacenamiento. La etapa de almacenamiento (2) puede o puede no estar por debajo de la temperatura ambiente (por ejemplo, a  $10 \pm 10^\circ\text{C}$ ).

La solicitud también desvela un procedimiento para preparar una composición de vacuna que comprende las etapas de: (1) mezclar (i) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo C, (ii) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo W135, (iii) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo Y y (iv) uno o más antígenos de polipéptidos del serogrupo B; y (2) extraer un volumen de dosis unitaria de los antígenos; y (c) envasar la dosis unitaria extraída en un recipiente herméticamente cerrado.

La etapa (1) también puede implicar mezclar (v) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo A. En un aspecto de la invención también implica mezclar (vi) un antígeno de sacárido capsular conjugado de Hib. También puede implicar mezclar (vii) un antígeno neumocócico. El recipiente herméticamente cerrado puede ser un vial o una jeringuilla.

La invención proporciona un recipiente herméticamente cerrado que contiene una composición de la invención.

#### **Información general**

El término "que comprende" significa "que incluye", además de "consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir en exclusivamente X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

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. Si es necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

Las referencias a una identidad de secuencias en porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de aminoácidos es el mismo comparando las dos secuencias. Este alineamiento y la homología o identidad de secuencias en porcentaje puede determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos descritos en sección 7.7.18 de la referencia 218. Un alineamiento preferido se determina por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afin con una penalización de hueco abierto de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2 de la matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en la referencia 219.

El término “alquilo” se refiere a grupos alquilo en formas tanto lineales como ramificadas. 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 dobles enlaces y/o triples. Sin embargo, el término “alquilo” normalmente se refiere a grupos alquilo que no tienen interrupciones de heteroátomos o interrupciones de dobles o triples enlaces. Cuando se hace referencia a alquilo C<sub>1-12</sub> se indica que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 12 (por ejemplo, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>). Similarmente, cuando se hace referencia a alquilo C<sub>1-6</sub> se indica que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 6 (por ejemplo, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>).

El término “cicloalquilo” incluye grupos cicloalquilo, policicloalquilo y cicloalqueno, además de 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-. Sin embargo, el término “cicloalquilo” normalmente se refiere a grupos cicloalquilo que no tienen interrupciones de heteroátomos. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen grupos ciclohexilo, ciclohexilo, cicloheximeto y adamantilo. Cuando se hace referencia a cicloalquilo C<sub>3-12</sub> se indica que el grupo cicloalquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>).

El término “arilo” se refiere a un grupo aromático tal como fenilo o naftilo. Cuando se hace referencia a arilo C<sub>5-12</sub> se indica que el grupo arilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 5 y 12 (por ejemplo, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>).

El término “aril C<sub>5-12</sub>-alquilo C<sub>1-6</sub>” 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 ftalimididas, trifluoroacetamididas, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, t-butoxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Z o Cbz), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (tales como β-trimetilsililetanosulfonilo (SES)), derivados de sulfenilo, alquilo C<sub>1-12</sub>, bencilo, benzhidrido, tritilo, 9-fenilfluorenilo, etc. Un grupo protector de nitrógeno preferido es Fmoc.

Las secuencias incluidas para facilitar la clonación o purificación, etc., no contribuyen necesariamente 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 formulas estructurales en el presente documento, las formas abiertas también están englobadas por la invención.

Los polipéptidos de la invención pueden prepararse por diversos medios (por ejemplo, expresión recombinante, purificación de cultivo celular, síntesis química (al menos en parte), etc.) y en diversas formas (por ejemplo, nativo, fusiones, no glucosilados, lipidados, etc.). Se preparan preferentemente en forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente libre de otras proteínas de *N. meningitidis* o de células huésped). Mientras que la expresión del polipéptido puede tener lugar en *Neisseria*, se prefiere un huésped heterólogo. El huésped heterólogo puede ser procariota (por ejemplo, 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* (por ejemplo, *M. tuberculosis*), levadura, etc.

El ácido nucleico según la invención puede prepararse de muchas formas (por ejemplo, por síntesis química (al menos en parte) a partir de bibliotecas genómicas o de ADNc, a partir del propio organismo, etc.) y puede tomar diversas formas (por ejemplo, monocatenario, bicatenario, vectores, sondas, etc.). Se preparan preferentemente en forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente libre de otros ácidos nucleicos de *N. meningitidis* o de células huésped). El término “ácido nucleico” incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tales como aquellos que contienen esqueletos modificados (por ejemplo, fosforotioatos, etc.), y también ácidos nucleicos de péptido (PNA), etc. La invención incluye ácido nucleico que comprende secuencias complementarias a las descritas anteriormente (por ejemplo, para fines antisentido o de sondaje).

Después del serogrupo, la clasificación meningocócica incluye serotipo, serosubtipo y luego 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 frecuentemente enfermedad

(hiperinvasiva), algunos linajes producen formas más graves de enfermedad que otras (hipervirulentas), y otras raramente producen enfermedad en absoluto. Se reconocen siete linajes hipervirulentos, concretamente los subgrupos I, III y IV-1, complejo ET-5, complejo ET-37, conjunto A4 y linaje 3. Éstos se han definido por electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), pero también se ha usado tipado de secuencias multilocus (MLST) para clasificar meningococos [ref. 104].

### **Modos para llevar a cabo la invención**

#### **Proteína híbrida $\Delta$ G287-953**

La proteína 287 que codifica ADN de la cepa 394/98 meningocócica del serogrupo B y la proteína 953 de la cepa 2996 meningocócica del serogrupo B se digirieron y se ligaron, junto con una secuencia conectora corta, dando un plásmido que codificaba la secuencia de aminoácidos SEC ID 7. El plásmido se transfectó en *E. coli* y las bacterias se cultivaron para expresar la proteína. Después del crecimiento adecuado, las bacterias se recogieron y la proteína se purificó. A partir del cultivo, las bacterias se centrifugaron y el sedimento se homogeneizó en presencia de tampón acetato 50 mM (pH 5) con una relación en volumen de pella:tampón de 1:8. La lisis se realizó usando un homogeneizador a alta presión (AVESTIN, 4 ciclos a 14000 psi). Después de la lisis se añadió urea a una concentración final de 5 M, seguido de agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. El pH se redujo de 6 a 5 usando tampón acetato 200 mM (pH 4) + urea 5 M. La mezcla se centrifugó a 16800 g durante 60 minutos a 2-8°C. El sobrenadante se recogió y se filtró por SARTOBRAN P (0,45-0,22  $\mu$ m de SARTORIUS). La proteína en el sobrenadante filtrado fue estable durante al menos 30 días a -20°C y durante al menos 15 días a 2-8°C.

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 estaban presentes en el flujo continuo. Un lavado de pre-elución usando una menor concentración de NaCl (180 mM) eliminó ventajosamente dos proteínas de *E. coli* contaminante.

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

El material eluido filtrado de la columna Q HP se diluyó 1:2 usando PBS a pH 7,00 (NaCl 150 mM + fosfato de potasio 10 mM, pH 7,00) y luego se diafiltró 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 30.000 Da de corte (membrana de celulosa regenerada de 50 cm<sup>2</sup>, Millipore PLCKT 30) fue posible dializar el material con un rendimiento de aproximadamente el 90%.

#### **Proteína híbrida 936- $\Delta$ G741**

La proteína 936 que codifica ADN de la cepa 2996 meningocócica del serogrupo B y la proteína 741 de la cepa MC58 meningocócica del serogrupo B se digirieron y se ligaron, junto con una secuencia conectora corta, dando un plásmido que codificaba la secuencia de aminoácidos SEC ID 8. El plásmido se transfectó en *E. coli* y las bacterias se cultivaron para expresar la proteína. La proteína recombinante no se secretó, pero permaneció soluble dentro de las bacterias.

Después del crecimiento adecuado, las bacterias se centrifugaron dando una pasta húmeda y se trataron del siguiente modo:

- Homogeneización mediante un sistema a alta presión en presencia de fosfato de sodio 20 mM a pH 7,00.
- Centrifugación y clarificación por filtración ortogonal.
- Cromatografía en columna catiónica (SP Sepharose Fast Flow), con elución con NaCl 150 mM en fosfato de sodio 20 mM a pH 7,00.
- Cromatografía en columna aniónica (Q Sepharose XL) con recogida en flujo continuo.
- Cromatografía en columna hidrófoba (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub) con elución con fosfato de sodio 20 mM, pH 7,00.
- Diafiltración contra PBS a pH 7,4 con un corte de 10 Kd.
- Esterilización por filtración 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°C.

#### **Proteína NcidA<sup>(NL)(C)</sup>**

La proteína NadA que codifica ADN de la cepa 2996 meningocócica del serogrupo B se digirió para eliminar la

secuencia que codificaba su extremo C dando un plásmido que codificaba la secuencia de aminoácidos SEC ID 1. El plásmido se transfectó 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 conductor estuvo ausente de la proteína secretada (SEC ID 2). El sobrenadante se trató del siguiente modo:

- 5 - Concentración 7X y diafiltración contra tampón TRIS 20 mM/HCl a pH 7,6 por UF de flujo cruzado (corte de 30 Kd).
- Cromatografía en columna aniónica (Q Sepharose XL) con elución con NaCl 400 mM en TRIS 20 mM/HCl a pH 7,6.
- 10 - Etapa de cromatografía en columna hidrófoba (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub) con elución con NaCl 50 mM en TRIS/HCl a pH 7,6.
- Cromatografía en columna cerámica de hidroxilapatita (HA Macro. Prep) con elución con fosfato de sodio 200 mM a pH 7,4.
- Diafiltración (corte de 30 Kd) contra PBS a pH 7,4
- Esterilización por filtración final y almacenamiento a -20°C
- 15 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 degradación, y formas truncadas de NadA pueden detectarse por transferencia Western o por espectrometría de masas (por ejemplo, por MALDI-TOF) que indica hasta una pérdida de 10 kDa de MW. Los productos de degradación pueden separarse de la NadA nativa por filtración en gel (por ejemplo, usando la columna TSK 300SWXL, precolumna TSKSWXL, TOSOHAAS). Tal filtración da tres picos: (i) un primer pico con tiempo de retención de 12,637 min y MW aparente de 885,036 Da; (ii) tiempo de retención de 13,871 min y MW aparente de 530,388 Da; (iii) tiempo de retención 13,871 min y MW aparente de 530,388 Da. El análisis de dispersión de la luz de los tres picos revela valores de MW reales 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.

25 Como el peso molecular predicho de NadA<sup>(NL)(C)</sup> es 34,113 Da, el pico (ii) contiene una proteína trimérica que es el antígeno deseado.

**Combinaciones antigénicas**

Se inmunizaron ratones con una composición que comprendía las tres proteínas y, para fines de comparación, las tres proteínas también se probaron individualmente. Se usaron diez ratones por grupo. La mezcla pudo inducir altos títulos bactericidas contra diversas cepas:

	Cepa meningocócica <sup>(serogrupo)</sup>							
	2996 <sup>(B)</sup>	MC58 <sup>(B)</sup>	NGH38	394/98 <sup>(B)</sup>	H44/76 <sup>(B)</sup>	F6124 <sup>(A)</sup>	BZ133 <sup>(C)</sup>	C11 <sup>(C)</sup>
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000
(2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4
(3)	32000	8000	-	-	-	8000	-	32000
<b>Mezcla</b>	<b>32000</b>	<b>32000</b>	<b>65000</b>	<b>16000</b>	<b>260000</b>	<b>65000</b>	<b>&gt;65000</b>	<b>8000</b>
'-' indica que esta cepa no contiene el gen NadA								

30 Observando ratones individuales, la triple mezcla indujo títulos bactericidas altos y coherentes contra las tres cepas del serogrupo B de las que se derivaron los antígenos individuales:

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>2996</b>	32768	16384	65536	32768	32768	65536	65536	32768	65536	8192
<b>MC58</b>	65536	32768	65536	65536	65536	8192	65536	32768	32768	65536
<b>394/98</b>	65536	4096	16384	4096	8192	4096	32768	16384	8192	16384

**Combinación y comparación con OMV**

5 En otros experimentos, los antígenos (20 µg de cada antígeno por dosis) se administraron en combinación con 10 µg de OMV preparadas tanto a partir de la cepa H44/76 (Noruega) como la cepa 394/98 (Nueva Zelanda). Los controles positivos fueron el mAb anti-SEAM-3 capsular para el serogrupo B o los conjugados CRM 197-sacáridos capsulares para otras cepas. La mezcla casi siempre dio mejores títulos que las OMV simples, y la adición de la mezcla a OMV casi siempre potenció significativamente la eficacia de las OMV. En muchos casos, la mezcla de antígenos igualó o superó la respuesta observada con el control positivo.

**Pruebas de linaje hipervirulento**

10 Se probaron los siguientes antígenos contra una variedad de cepas del serogrupo B a partir de una variedad de linajes hipervirulentos:

(a) NadA<sup>(NL)(C)</sup>

(b) ΔG287-953

(c) 936-ΔG741

15 (d) una mezcla de (a), (b) y (c)

(e) OMV preparadas a partir de la cepa H44/76 (Noruega)

(f) OMV preparada a partir de la cepa 394/98 (Nueva Zelanda)

(g) una mezcla de ΔG287 y (e)

(h) una mezcla de (d) y (e)

20 (i) una mezcla de (d) y (f)

SEAM-3 se usó como control positivo.

Los resultados fueron del siguiente modo, expresados como el porcentaje de cepas en el linaje hipervirulento indicado cuando el título bactericida en suero superó 1024:

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

25

Contra cepas de referencia particulares, los títulos bactericidas fueron del siguiente modo:

	<b>Cepa</b>	<b>(a)</b>	<b>(b)</b>	<b>(c)</b>	<b>(d)</b>	<b>(e)</b>	<b>(f)</b>	<b>(g)</b>	<b>(h)</b>	<b>(i)</b>	<b>S-3</b>
<b>A4</b>	961-5945	128	2048	<8	2048	262144	8192	262144	162144	4096	8192
<b>ET-5</b>	44/76	<4	2048	32768	131072	524288	8192	524288	524288	524288	16384
<b>Linaje 3</b>	394/98	<4	1024	32	4096	<4	16384	256	16384	16384	16384
<b>ET-37</b>	LPN17592	2048	1024	256	4096	<8	<8	512	16384	65536	1024



Por tanto, las composiciones (d), (h) y (i) inducen respuestas de anticuerpos bactericidas contra una amplia variedad de cepas de meningococo del serogrupo B dentro de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3. Los títulos usando las composiciones (h) y (i) fueron generalmente superiores a con (d), pero la cobertura de las cepas dentro de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 no fue mejor.

- 5 La cobertura de cepas sin tipar también fue alta con las composiciones (d), (h) y (i).

**Combinación con conjugados meningocócicos y/o de Hib**

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

Componente	Cantidad por 0,5 ml de dosis
Conjugado de serogrupo C	10 µg de sacárido + 12,5-25 µg de CRM <sub>197</sub>
Conjugado de serogrupo W135	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM <sub>197</sub>
Conjugado de serogrupo Y	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM <sub>197</sub>
ΔG287-953	20 µg de polipéptido
936-ΔG741	20 µg de polipéptido
NadA	20 µg de polipéptido

10

Se prepara una vacuna similar que incluye conjugado de MenA (10 µg de sacárido + 12,5-33 µg de CRM<sub>197</sub>) y/o un conjugado de Hib HbOC (10 µg de sacárido + 2-5 µg de CRM<sub>197</sub>).

15

En una serie de pruebas se combinaron los conjugados de los serogrupos C, W135 e Y, estando cada conjugado presente a 40 µg/ml (medido como sacárido). Para el almacenamiento antes de uso con antígenos de MenB, los conjugados combinados se liofilizaron [-45°C durante 3 horas, -35°C durante 20 horas a 6,65 MPa a vacío, 30°C durante 10 horas a 6,65 MPa, 30°C durante 9 horas a 125 mTorr] en presencia de 15 mg de sacarosa, tampón fosfato 10 mM (pH 7,2). El volumen final antes de la liofilización fue 0,3 ml. Por tanto, después de la resuspensión en 0,6 ml de disolución acuosa, los sacáridos están presentes a 12 µg por serogrupo. La liofilización se usó sólo por comodidad, y ni la eficacia ni la estabilidad durante el almacenamiento normal del producto final requieren liofilización.

20

Se preparó un segundo lote de material de la misma forma, pero también incluyendo el conjugado del serogrupo A a la misma dosificación de sacárido que para los serogrupos C, W135 e Y.

Se preparó un tercer lote de material de la misma forma (serogrupos A, C, W135 e Y), pero también incluyendo un conjugado de Hib-CRM<sub>197</sub> a la misma dosificación de sacárido que para los meningococos.

25

Para la comparación se prepararon preparaciones liofilizadas de los conjugados del serogrupo A y C. El material de MenA se liofilizó con 15 mg de sacarosa dando una dosis de 12 µg de sacárido después de la reconstitución como se ha descrito anteriormente. El material de MenC se liofilizó con 9 mg de manitol dando una dosis de 12 µg de sacárido después de la reconstitución.

30

Estos materiales se combinaron con 600 µl de la mezcla de serogrupos (d) (o, como control, es decir, los grupos 2 y 3, en una composición idéntica pero que carece de los antígenos) dando ocho composiciones:

Componentes	1	2	3	4	5	6	7	8
NadA <sup>(NL)(C)</sup> µg/dosis	20			20	20	20	20	20
936-741 µg/dosis	20			20	20	20	20	20
287-953 µg/dosis	20			20	20	20	20	20
MenA-CRM µg/dosis*		2,4	2,4	2,4			2,4	2,4

MenC-CRM µg/dosis*		2,4	2,4		2,4	2,4	2,4	2,4
MenW-CRM µg/dosis*		2,4	2,4			2,4	2,4	2,4
MenY-CRM µg/dosis*		2,4	2,4			2,4	2,4	2,4

(cont)

Componentes	1	2	3	4	5	6	7	8
Hib-CRM µg/dosis*			2,4					2,4
Hidróxido de aluminio mg/dosis	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Histidina mM	10	10	10	10	10	10	10	10
Sacarosa mg/dosis		3	3	3		3	3	3
Manitol mg/dosis					1,8			
Fosfato de potasio a pH 7,2 mM		3	3	3		3	3	3
Fosfato de sodio a pH 7,2 mM					3			
Cloruro sódico mg/dosis	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
* La cantidad mostrada es sacárido								

5 Estas composiciones se administraron intraperitonealmente en un volumen de 200 µl a CD/l ratones (8 por grupo) en los días 0, 21 y 35, con un sangrado final en el día 49. Los sueros del día 49 se probaron en ensayos de SBA contra una variedad de cepas meningocócicas en los serogrupos A, B, C, W135 e Y. Los resultados fueron:

Grupo	B				A	C				W135 LPN17592	Y 860800
	2996	MC58	394/98	44/76		F6124	C11	312294	C4678		
1	1024	4096	1024	8192	2048	2048	<16*	64*	128*	512	65536
2	<4	<4	128	<16	4096	8192	-	-	-	32	32768
3	<4	<4	<4	<16	4096	16384	-	-	-	512	32768
4	64	4096	512	8192	8192	128	-	-	-	256	32768
5	256	4096	1024	8192	256	8192	>8192	>8192	>8192	512	32768
6	128	1024	256	8192	128	8192	8192	>8192	>8192	512	16384
7	256	512	512	16384	1024	8192	4096	>8192	>8192	1024	16384
8	256	2048	512	8192	1024	8192	2048	>8192	>8192	512	32768

Por tanto, el antígeno meningocócico de proteínas sigue siendo eficaz incluso después de la adición de los antígenos de sacáridos meningocócicos y de Hib conjugados. Similarmente, los conjugados meningocócicos retienen la eficacia incluso después de la adición de los antígenos de proteínas. De hecho, los datos sugieren que la adición de los antígenos de proteínas a los conjugados potencia la eficacia anti-MenW135 (véanse los grupos 2 y 7).

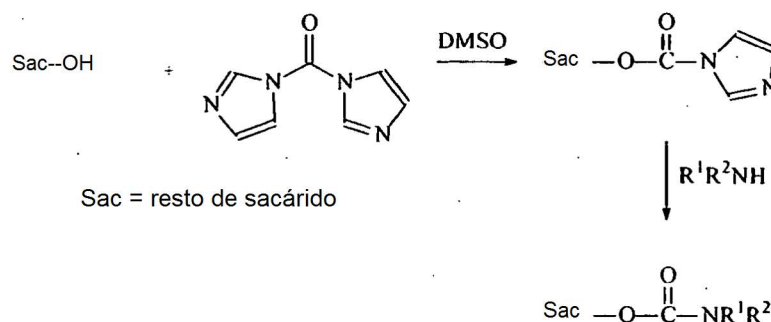
- 5 Además, hay un nivel de reactividad cruzada, en particular para el serogrupo Y, ya que los antígenos de proteínas solos dan un buen título anti-MenY [véase la referencia 220] como los grupos 4 y 5.

Los datos también indican que la adición de un conjugado de Hib a conjugados meningocócicos (véanse los grupos 2 y 3) potencia la actividad anti-W135.

#### Uso de sacárido de MenA modificado

- 10 El polisacárido capsular se purificó a partir de MenA y se hidrolizó dando el oligosacárido de MenA. El polisacárido (2 g) se hidrolizó a 50°C en tampón acetato sódico 50 mM, pH 4,75, a una concentración de polisacárido de 10 mg/ml durante aproximadamente 4 horas [73]. Después de la hidrólisis, la disolución se secó mediante evaporación rotatoria.

El oligosacárido se activó usando el siguiente esquema de reacción:



- 15 El oligosacárido se disolvió en DMSO dando una concentración de sacárido de 10 mg/ml. Según una relación molar de oligosacárido:CDI que es 1:20, luego 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 por precipitación selectiva en una mezcla de 80:20 (v/v) de acetona:DMSO seguido de centrifugación. Se calculó que la eficiencia de la reacción de activación era aproximadamente el 67,9% determinando la relación de imidazol libre con respecto a imidazol unido.
- 20

- En la segunda etapa de reacción, el oligosacárido de MenA-CDI se solubilizó en DMSO a una concentración de sacárido de aproximadamente 10 mg/ml. Según una relación molar de unidad de MenA-CDI:DMA que es 1:100 se añadieron 36,288 g de clorhidrato de dimetilamina al 99% (es decir, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> = Me) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El producto de reacción se liofilizó y se resolubilizó en 10 mg/ml de disolución de agua.
- 25

- Para eliminar el reactivo de reacción de bajo peso molecular (en particular la dimetilamina (DMA)) de la preparación de oligosacáridos se realizó una etapa de diálisis a través de una membrana de MWCO de 3,5 kDa (Spectra/Por<sup>™</sup>). Se llevaron a cabo cuatro etapas de diálisis: (i) 16 horas contra 2 l de cloruro sódico 1 M (factor de diálisis 1:20), (ii) 16 horas contra 2 l de cloruro sódico 0,5 M (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 de MWCO de 1 kDa (Centricon<sup>™</sup>).
- 30

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

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

- 35
- hidrólisis del polisacárido dando fragmentos de oligosacáridos
  - dimensionado de los fragmentos de oligosacáridos
  - aminación reductora de grupos aldehído terminales sobre los oligosacáridos dimensionados
  - protección de grupos -NH<sub>2</sub> terminales por el grupo Fmoc antes de la reacción de CDI
  - desprotección intrínseca de grupos -NH<sub>2</sub> durante la reacción de DMA
- 40
- activación de grupos -NH<sub>2</sub> terminales por SIDEA (ácido N-hidroxisuccinimida-adípico)

- unión covalente a la proteína CRM<sub>197</sub>

5 El conjugado de oligosacárido de MenA modificado fue 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 el 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 aquellos obtenidos usando las estructuras de azúcar nativa.

El conjugado de MenA modificado se combina con conjugados de MenC, MenW135 y MenY como sustituto del conjugado de oligosacárido sin modificar. Esta mezcla tetravalente se mezcla con los tres polipéptidos de MenB dando una vacuna eficaz contra los serogrupos A, B, C, W135 e Y de *N. meningitidis* en una dosis única.

#### 10 **Combinaciones neumocócicas**

Las tres proteínas de MenB combinadas se mezclan con conjugados de sacáridos neumocócicos dando 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:

Componente	Cantidad por 0,5 ml de dosis
Conjugado de serogrupo A	5 µg de sacárido + 6,25-16,5 µg de CRM <sub>197</sub>
Conjugado de serogrupo C	5 µg de sacárido + 6,25-12,5 µg de CRM <sub>197</sub>
Conjugado de serogrupo W 135	5 µg de sacárido + 3,3-10 µg de CRM <sub>197</sub>
Conjugado de serogrupo Y	5 µg de sacárido + 3,3-10 µg de CRM <sub>197</sub>
Conjugado del serotipo 4 de neumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM <sub>197</sub>
Conjugado del serotipo 9V de neumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM <sub>197</sub>
Conjugado del serotipo 14 de neumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM <sub>197</sub>
Conjugado del serotipo 18C de neumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM <sub>197</sub>
Conjugado del serotipo 19F de neumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM <sub>197</sub>
Conjugado del serotipo 23F de neumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM <sub>197</sub>
Conjugado del serotipo 6B de neumococo	4 µg de sacárido + 5 µg de CRM <sub>197</sub>

15 Se entenderá que la invención sólo se ha descrito a modo de ejemplo y que pueden hacerse modificaciones mientras sigan dentro del alcance de la invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas.

#### **REFERENCIAS**

- [1] Darkes y Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
- 20 [2] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [3] Armand y col. (1982) *J. Biol. Stand* 10:335-339.
- [4] Cadoz y col. (1985) *Vaccine* 3:340-342.
- [5] Baklaic y col. (1983) *Infect. Immun.* 42:599-604.
- [6] *MMWR* (1997) 46(RR-5) 1-10.
- 25 [7] Bjune y col. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-96
- [8] Frash (1990) p.123-145 of *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi y Van Wezel)
- [9] WO03/007985.
- [10] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.

- [11] WO02/058737.
- [12] Solicitud de patente de RU GB-0408978.5. [ref. del apoderado: P037501GB].
- [13] Kandil y col. (1997) Glycoconj J 14:13-17.
- [14] Berkin y col. (2002) Chemistry 8:4424-4433.
- 5 [15] Glode y col. (1979) J Infect Dis 139:52-56
- [16] WO94/05325; patente de EE.UU. 5.425.946.
- [17] W02005/033148.
- [18] WO03/080678.
- [19] Nilsson y Svensson (1979) Carbohydrate Research 69: 292-296)
- 10 [20] Ramsay y col. (2001) Lancet 357(9251):195-196.
- [21] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36.
- [22] Buttery y Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-168.
- [23] Ahmad y Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii.
- [24] Goldblatt (1998) J. Med Microbiol. 47:563-567.
- 15 [25] European patent 0477508.
- [26] Patente de EE.UU. 5.306.492.
- [27] WO98/42721.
- [28] Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) ISBN 3805549326, particularly vol. 10:48-114.
- [29] Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 o 012342335X.
- 20 [30] Anonymous (Jan 2002), 453077.
- [31] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.
- [32] Anderson y col. (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.
- [33] EP-A-0372501.
- [34] EP-A-0378881.
- 25 [35] EP-A-0427347.
- [36] WO93/17712
- [37] WO94/03208.
- [38] WO98/58668.
- [39] EP-A-0471177.
- 30 [40] WO91/01146
- [41] Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
- [42] Baraldo et al, (2004) Infect Immun.72:4884-7
- [43] EP-A-0594610.
- [44] WO00/56360.
- 35 [45] Kuo y col. (1995) Infect Immun 63:2706-13.
- [46] WO02/091998.
- [47] WO01/72337

- [48] WO00/61761.  
[49] WO2004/083251.  
[50] WO99/42130  
[51] WO96/40242  
5 [52] Lees y col. (1996) *Vaccine* 14:190-198.  
[53] WO95/08348.  
[54] Patente de EE.UU. 4.882.317  
[55] Patente de EE.UU. 4.695.624  
[56] Porro y col. (1985) *Mol Immunol* 22:907-919.  
10 [57] EP-A-0208375  
[58] WO00/10599  
[59] Gever y col. *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).  
[60] Patente de EE.UU. 4.057.685.  
[61] Patentes de EE.UU. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.  
15 [62] Patente de EE.UU. 4.459.286.  
[63] Patente de EE.UU. 4.965.338  
[64] Patente de EE.UU. 4.663.160.  
[65] Patente de EE.UU. 4.761.283  
[66] Patente de EE.UU. 4.356.170  
20 [67] Lei y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.  
[68] WO00/38711; patente de EE.UU. 6.146.902.  
[69] Lamb y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:251-258.  
[70] Lamb y col. (2000) *Journal of Chromatography A* 894:311-318.  
[71] D'Ambra y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:241-242.  
25 [72] Ravenscroft y col. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.  
[73] Costantino y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.  
[74] Parkhill y col. (2000) *Nature* 404:502-506.  
[75] Tettelin y col. (2000) *Science* 287:1809-1815.  
[76] WO00/66791.  
30 [77] Pizza y col. (2000) *Science* 287:1816-1820.  
[78] WO99/24578.  
[79] WO99/36544.  
[80] WO99/57280.  
[81] WO00/22430.  
35 [82] WO00/66741.  
[83] WO01/64920.  
[84] WO01/64922.



- [85] WO03/020756.
- [86] W02004/014419.
- [87] WO99/31132; patente de EE.UU. 6.495.345.
- [88] WO99/58683.
- 5 [89] Peak y col. (2000) FEMS Immunol Med Microbiol 28:329-334.
- [90] WO93/06861.
- [91] EP-A-0586266.
- [92] WO92/03467.
- [93] Patente de EE.UU. 5912336.
- 10 [94] W02004/015099.
- [95] WO2004/014418.
- [96] Solicitudes de patente de RU 0223741.0, 0305831.0 y 0309115.4; y WO2004/032958.
- [97] Comanducci y col. (2002) J. Exp. Med. 195:1445-1454.
- [98] WO03/010194.
- 15 [99] WO2004/048404
- [100] WO03/063766.
- [101] Massignani y col. (2003) J Exp Med 197:789-799.
- [102] <http://neisseria.org/nml/typing/mlst/>
- [103] Pettersson y col. (1994) Microb Pathog 17(6):395-408.
- 20 [104] Maiden y col. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
- [105] 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 B and C Neisseria meningitidis* strains.
- 25 [106] 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.*
- [107] WO96/14086.
- [108] Vaccines (eds. Plotkin y Mortimer), 1988. ISBN: 0-7216-1946-0
- [109] Gustafsson y col. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
- 30 [110] Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9:232-238.
- [111] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188.
- [112] Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.
- [113] Gerlich y col. (1990) Vaccine 8 Suppl:S63-68 y 79-80.
- [114] WO93/24148.
- 35 [115] Sutter y col. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308.
- [116] Zimmerman y Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126.
- [117] Charalambous y Feavers (2001) J Med Microbiol 50:937-939.
- [118] Westerink (2001) Int Rev Immunol 20:251-261.

- [119] Grothaus y col. (2000) *Vaccine* 18:1253-1263.
- [120] Kanra y col. (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42:421-427.
- [121] Ravenscroft y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103: 35-47.
- [122] WO97/00697.
- 5 [123] WO02/00249.
- [124] WO96/37222; patente de EE.UU. 6.333.036.
- [125] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [126] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [127] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- 10 [128] Zielen y col. (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.
- [129] Tettelin y col. (2001) *Science* 293:498-506.
- [130] Hoskins et al (2001) *J Bacteriol* 183:5709-5717.
- [131] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3:445-450
- [132] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19:2688-2691.
- 15 [133] Massignani y col. (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:895-905.
- [134] Mora y col. (2003) *Drug Discov Today* 8:459-464.
- [135] Wizemann y col. (2001) *Infect Immun* 69:1593-1598.
- [136] Rigden y col. (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:143-168.
- [137] WO02/22167.
- 20 [138] Paoletti y col. (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
- [139] WO00/56365.
- [140] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [141] WO03/009869.
- [142] *Vaccine Design*. (1995) eds. Powell y Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- 25 [143] WO00/23105.
- [144] WO90/14837.
- [145] Patente de EE.UU. 5.057.540.
- [146] WO96/33739.
- [147] EP-A-0109942.
- 30 [148] WO96/11711.
- [149] WO00/07621.
- [150] Barr y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [151] Sjolanderet y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [152] Niikura y col. (2002) *Virology* 293:273-280.
- 35 [153] Lenz y col. (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [154] Pinto y col. (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [155] Gerber y col. (2001) *Virology* 75:4752-4760.

- [156] WO03/024480
- [157] WO03/024481
- [158] Gluck y col. (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [159] EP-A-0689454.
- 5 [160] Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [161] Evans y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [162] Meraldi y col. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [163] Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [164] Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- 10 [165] WO02/26757.
- [166] WO99/62923.
- [167] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [168] McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [169] WO98/40100.
- 15 [170] Patente de EE.UU. 6.207.646.
- [171] Patente de EE.UU. 6.239.116.
- [172] Patente de EE.UU. 6.429.199.
- [173] Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [174] Blackwell y col. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- 20 [175] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [176] WO01/95935.
- [177] Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [178] Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [179] WO03/035836.
- 25 [180] WO95/17211.
- [181] WO98/42375.
- [182] Beignon y col. (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [183] Pizza y col. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [184] Pizza y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- 30 [185] Scharton-Kersten y col. (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [186] Ryan y col. (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [187] Partidos y col. (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [188] Peppoloni y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [189] Pine y col. (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- 35 [190] Domenighini y col. (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [191] WO99/40936.
- [192] WO99/44636.

- [193] Singh et al] (2001) J Cont Release 70:267-276.
- [194] WO99/27960.
- [195] Patente de EE.UU. 6.090.406
- [196] Patente de EE.UU. 5.916.588
- 5 [197] EP-A-0626169.
- [198] WO99/52549.
- [199] WO01/21207.
- [200] WO01/21152.
- [201] Andrianov y col. (1998) Biomaterials 19:109-115.
- 10 [202] Payne y col. (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-196.
- [203] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.
- [204] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.
- [205] WO99/11241.
- [206] WO94/00153.
- 15 [207] WO98/57659.
- [208] Solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.
- [209] WO01/30390.
- [210] Almeida y Alpar (1996) J. Drug Targeting 3:455-467.
- [211] Agarwal y Mishra (1999) Indian J Exp Biol 37:6-16.
- 20 [212] WO00/53221.
- [213] Jakobsen y col. (2002) Infect Immun 70:1443-1452.
- [214] Wu y col. (1997) J Infect Dis 175:839-846.
- [215] Bergquist y col. (1998) APMIS 106:800-806.
- [216] Baudner y col. (2002) Infect Immun 70:4785-4790.
- 25 [217] Ugozzoli y col. (2002) J Infect Dis 186:1358-1361.
- [218] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1987) Supplement 30.
- [219] Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.
- [220] Solicitud de patente de RU 0408977.7. [ref. del apoderado: P037500GB].

#### LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID	
1	NadA de la cepa 2996, con delección del extremo C
2	NadA de la cepa 2996, con delección del extremo C y péptido conductor procesado
3	$\Delta$ G741 de la cepa MC58
4	936 de la cepa MC58 con péptido conductor procesado
5	953 de la cepa MC58 con péptido conductor procesado
6	$\Delta$ G287 de la cepa MC58

SEC ID	
7	Híbrido de 287-953
8	Híbrido de 936-741
9	Conector
10	Secuencia de 741
11	Secuencia de 741
12	Secuencia de 741

<110> NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS SRL

<120> VACUNAS LÍQUIDAS PARA MÚLTIPLES SEROGRUPOS MENINGOCÓCICOS

<130> P050770EP

5 <140> EP-08

<141> 04-10-2004

<150> PCT/IB2004/003373

<151> 04-10-2004

<150> GB0323102.4

10 <151> 02-10-2003

<150> GB0412052.3

<151> 28-05-2004

<160> 12

<170> SeqWin99, versión 1.02

15 <210> 1

<211> 350

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 1

Met Lys His Phe Pro Ser Lys Val Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Thr  
1 5 10 15

20 Phe Cys Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys

			20					25					30				
Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asn	Asn	Gly	Gln	Glu	Ile		
		35					40					45					
Asn	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Ile	Tyr	Asp	Ile	Asp	Glu	Asp	Gly		
	50					55					60						
Thr	Ile	Thr	Lys	Lys	Asp	Ala	Thr	Ala	Ala	Asp	Val	Glu	Ala	Asp	Asp		
65					70					75					80		
Phe	Lys	Gly	Leu	Gly	Leu	Lys	Lys	Val	Val	Thr	Asn	Leu	Thr	Lys	Thr		
				85					90					95			
Val	Asn	Glu	Asn	Lys	Gln	Asn	Val	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ala	Glu		
			100					105					110				
Ser	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu	Thr	Thr	Lys	Leu	Ala	Asp	Thr	Asp	Ala	Ala		
		115					120					125					
Leu	Ala	Asp	Thr	Asp	Ala	Ala	Leu	Asp	Ala	Thr	Thr	Asn	Ala	Leu	Asn		
	130					135						140					
Lys	Leu	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Phe	Ala	Glu	Glu	Thr	Lys	Thr	Asn		
145					150					155					160		
Ile	Val	Lys	Ile	Asp	Glu	Lys	Leu	Glu	Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Val	Asp		
				165					170					175			
Lys	His	Ala	Glu	Ala	Phe	Asn	Asp	Ile	Ala	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Thr		
			180					185						190			
Asn	Thr	Lys	Ala	Asp	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	Ala	Asn	Glu	Ala	Lys	Gln		
		195					200					205					
Thr	Ala	Glu	Glu	Thr	Lys	Gln	Asn	Val	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ala		
	210					215						220					
Glu	Thr	Ala	Ala	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Asn	Thr		
225					230					235					240		
Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Val	Thr	Asp	Ile	Lys		
				245					250					255			
Ala	Asp	Ile	Ala	Thr	Asn	Lys	Asp	Asn	Ile	Ala	Lys	Lys	Ala	Asn	Ser		
			260					265					270				
Ala	Asp	Val	Tyr	Thr	Arg	Glu	Glu	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Val	Arg	Ile		
		275					280					285					
Asp	Gly	Leu	Asn	Ala	Thr	Thr	Glu	Lys	Leu	Asp	Thr	Arg	Leu	Ala	Ser		
	290					295					300						
Ala	Glu	Lys	Ser	Ile	Ala	Asp	His	Asp	Thr	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Asp		

305					310						315					320
Lys	Thr	Val	Ser	Asp	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Arg	Gln	Gly	Leu	Ala	Glu	
				325					330					335		
Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Phe	Gln	Pro	Tyr	Asn	Val	Gly			
			340					345					350			

<210> 2

<211> 327

<212> PRT

5 <213> *Neisseria meningitidis*

<400> 2

ES 2 363 182 T3

Ala Thr Asn Asp Asp Asp Val Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala  
1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu  
20 25 30

Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala  
35 40 45

Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys  
50 55 60

Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn  
65 70 75 80

Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr  
85 90 95

Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala  
100 105 110

Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr  
115 120 125

Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys  
130 135 140

Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe Asn  
145 150 155 160

Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp Glu Ala  
165 170 175

Val Lys Thr Ala Asn Glu Ala Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln  
180 185 190

Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala  
195 200 205

Glu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Asn Thr Ala Ala Asp Lys Ala Glu Ala



ES 2 363 182 T3

210		215		220													
Val	Ala	Ala	Lys	Val	Thr	Asp	Ile	Lys	Ala	Asp	Ile	Ala	Thr	Asn	Lys		
225					230					235					240		
Asp	Asn	Ile	Ala	Lys	Lys	Ala	Asn	Ser	Ala	Asp	Val	Tyr	Thr	Arg	Glu		
				245					250					255			
Glu	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Val	Arg	Ile	Asp	Gly	Leu	Asn	Ala	Thr	Thr		
			260					265					270				
Glu	Lys	Leu	Asp	Thr	Arg	Leu	Ala	Ser	Ala	Glu	Lys	Ser	Ile	Ala	Asp		
		275					280					285					
His	Asp	Thr	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Thr	Val	Ser	Asp	Leu	Arg		
	290					295					300						
Lys	Glu	Thr	Arg	Gln	Gly	Leu	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu		
305					310					315					320		
Phe	Gln	Pro	Tyr	Asn	Val	Gly											
				325													

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 3

ES 2 363 182 T3

Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro  
 1 5 10 15  
 Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser  
 20 25 30  
 Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys  
 35 40 45  
 Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp  
 50 55 60  
 Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln  
 65 70 75 80  
 Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His  
 85 90 95  
 Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His  
 100 105 110  
 Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala  
 115 120 125  
 Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr  
 130 135 140  
 Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His  
 165 170 175  
 Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys  
 180 185 190  
 Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn  
 195 200 205  
 Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala  
 210 215 220  
 Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg  
 225 230 235 240  
 His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln  
 245

<210> 4

<211> 179

5 <212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 4

Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala Val  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala Leu  
 20 25 30  
 Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr  
 35 40 45  
 Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asn Arg His Leu  
 50 55 60  
 Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly  
 65 70 75 80  
 Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile  
 85 90 95  
 Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr  
 100 105 110  
 Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala  
 115 120 125  
 Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Tyr Gly Asn Val Thr Tyr Val  
 130 135 140  
 Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr Gln Lys Val  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val Ile Thr Leu Tyr Gln Asn Tyr  
 165 170 175  
 Val Gln Arg

5 <210> 5

<211> 168

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 5

ES 2 363 182 T3

Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile  
 1 5 10 15  
 Asp His Phe Asn Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr  
 20 25 30  
 Gly Ser Val Glu Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile  
 35 40 45  
 Thr Ile Pro Ile Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp  
 50 55 60  
 His Leu Lys Ser Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile  
 65 70 75 80  
 Arg Phe Val Ser Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser  
 85 90 95  
 Val Asp Gly Asn Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu  
 100 105 110  
 Lys Ala Glu Lys Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Glu Lys Thr Glu  
 115 120 125  
 Val Cys Gly Gly Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly  
 130 135 140  
 Met Asp Tyr Leu Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp  
 145 150 155 160  
 Ile Gln Ile Glu Ala Ala Lys Gln  
 165

<210> 6

<211> 464

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 6

Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro  
 1 5 10 15  
 Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala  
 20 25 30  
 Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asp Met  
 35 40 45  
 Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Val Thr Ala  
 50 55 60  
 Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu Val Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln  
 65 70 75 80  
 Asn Ala Ala Gly Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Asp Pro  
 85 90 95  
 Asn Met Leu Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu  
 100 105 110  
 Ser Ser Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly  
 115 120 125  
 Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr  
 130 135 140  
 Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser  
 165 170 175  
 Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro  
 180 185 190  
 Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly  
 195 200 205  
 Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys  
 210 215 220  
 Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn  
 225 230 235 240  
 Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile  
 245 250 255  
 Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg  
 260 265 270  
 Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro

	275		280		285														
Leu	Ile	Pro	Val	Asn	Gln	Ala	Asp	Thr	Leu	Ile	Val	Asp	Gly	Glu	Ala				
	290					295					300								
Val	Ser	Leu	Thr	Gly	His	Ser	Gly	Asn	Ile	Phe	Ala	Pro	Glu	Gly	Asn				
305					310					315					320				
Tyr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Ala	Glu	Lys	Leu	Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr				
				325					330					335					
Ala	Leu	Arg	Val	Gln	Gly	Glu	Pro	Ala	Lys	Gly	Glu	Met	Leu	Ala	Gly				
			340					345					350						
Ala	Ala	Val	Tyr	Asn	Gly	Glu	Val	Leu	His	Phe	His	Thr	Glu	Asn	Gly				
		355					360					365							
Arg	Pro	Tyr	Pro	Thr	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Ala	Lys	Val	Asp	Phe	Gly				
	370					375					380								
Ser	Lys	Ser	Val	Asp	Gly	Ile	Ile	Asp	Ser	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Met				
385					390					395				400					
Gly	Thr	Gln	Lys	Phe	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	Gly	Asn	Gly	Phe	Lys	Gly				
				405					410					415					
Thr	Trp	Thr	Glu	Asn	Gly	Ser	Gly	Asp	Val	Ser	Gly	Lys	Phe	Tyr	Gly				
			420					425					430						
Pro	Ala	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Pro	Thr	Asp				
		435					440					445							
Ala	Glu	Lys	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Phe	Ala	Gly	Lys	Lys	Glu	Gln	Asp				
	450					455					460								

<210> 7

<211> 644

<212> PRT

5 <213> Neisseria meningitidis

<400> 7

ES 2 363 182 T3

Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala  
1 5 10 15  
Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro  
20 25 30  
Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Gly Gln  
35 40 45  
Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala  
50 55 60

Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Ala Gln Asn Asp Met  
 65 70 75 80  
 Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro  
 85 90 95  
 Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Pro Asp Ala  
 100 105 110  
 Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Thr Ala  
 115 120 125  
 Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Glu Asn Ala Gly  
 130 135 140  
 Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Ser Ala Thr Asn Ser  
 165 170 175  
 Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp  
 180 185 190  
 Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys  
 195 200 205  
 Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe  
 210 215 220  
 Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly  
 225 230 235 240  
 Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser  
 245 250 255  
 Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys  
 260 265 270  
 Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser  
 275 280 285  
 Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu  
 290 295 300  
 Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile  
 305 310 315 320  
 Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys  
 325 330 335  
 Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ser Lys  
 340 345 350



Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His  
 355 360 365  
 Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Ala  
 370 375 380  
 Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser  
 385 390 395 400  
 Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp  
 405 410 415  
 Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val  
 420 425 430  
 Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr  
 435 440 445  
 Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala  
 450 455 460  
 Gly Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Lys  
 465 470 475 480  
 Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile Asp His Phe Asn  
 485 490 495  
 Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu  
 500 505 510  
 Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val  
 515 520 525  
 Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp His Leu Lys Ser  
 530 535 540  
 Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser  
 545 550 555 560  
 Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser Val Asp Gly Asn  
 565 570 575  
 Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys  
 580 585 590  
 Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly  
 595 600 605  
 Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu  
 610 615 620  
 Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu  
 625 630 635 640

Ala Ala Lys Gln

<210> 8

<211> 434

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

5 <400> 8

Met	Val	Ser	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Lys	Ser	Ala
1				5					10					15	
Val	Asp	Arg	Arg	Thr	Thr	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Asp	Asn	Val	Met	Ala
			20					25					30		
Leu	Arg	Ile	Glu	Thr	Thr	Ala	Arg	Ser	Tyr	Leu	Arg	Gln	Asn	Asn	Gln
		35					40					45			
Thr	Lys	Gly	Tyr	Thr	Pro	Gln	Ile	Ser	Val	Val	Gly	Tyr	Asn	Arg	His
	50					55					60				
Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Glu	Gly	Glu	Lys	Gln	Phe	Val
65					70					75					80
Gly	Gln	Ile	Ala	Arg	Ser	Glu	Gln	Ala	Ala	Glu	Gly	Val	Tyr	Asn	Tyr
				85					90					95	
Ile	Thr	Val	Ala	Ser	Leu	Pro	Arg	Thr	Ala	Gly	Asp	Ile	Ala	Gly	Asp
			100					105					110		
Thr	Trp	Asn	Thr	Ser	Lys	Val	Arg	Ala	Thr	Leu	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro
		115					120					125			
Ala	Thr	Gln	Ala	Arg	Val	Lys	Ile	Val	Thr	Tyr	Gly	Asn	Val	Thr	Tyr
	130					135					140				
Val	Met	Gly	Ile	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Gln	Ala	Gln	Ile	Thr	Gln	Lys
145					150					155					160
Val	Ser	Thr	Thr	Val	Gly	Val	Gln	Lys	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gln	Asn
				165					170					175	
Tyr	Val	Gln	Arg	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Asp	Ile	Gly
			180					185					190		
Ala	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Ala	Pro	Leu	Asp	His	Lys	Asp	Lys
		195					200					205			
Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Val	Arg	Lys	Asn	Glu	Lys
	210					215					220				
Leu	Lys	Leu	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Glu	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Asp
225					230					235					240

Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp  
 245 250 255

Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser  
 260 265 270

Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe  
 275 280 285

Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala  
 290 295 300

Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe  
 305 310 315 320

Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe  
 325 330 335

Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala  
 340 345 350

Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu  
 355 360 365

Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His  
 370 375 380

Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser  
 385 390 395 400

Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser  
 405 410 415

Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala  
 420 425 430

Lys Gln

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia conectora

<400> 9

Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5

10 <210> 10

<211> 255

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 10

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu  
 1. 5 10 15  
 Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln  
 20 25 30  
 Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu  
 35 40 45  
 Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn  
 50 55 60  
 Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg  
 65 70 75 80  
 Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe  
 85 90 95  
 Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu  
 100 105 110  
 Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln  
 115 120 125  
 Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu  
 130 135 140  
 Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp  
 145 150 155 160  
 Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln  
 165 170 175  
 Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp  
 180 185 190  
 Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile  
 195 200 205  
 Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu  
 210 215 220  
 Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val  
 225 230 235 240  
 Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln  
 245 250 255

5

<210> 11

<211> 254

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 11

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln  
 20 25 30  
 Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu  
 35 40 45  
 Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn  
 50 55 60  
 Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg  
 65 70 75 80  
 Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe  
 85 90 95  
 Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu  
 100 105 110  
 Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser  
 115 120 125  
 Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu  
 130 135 140  
 Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly  
 165 170 175  
 His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu  
 180 185 190  
 Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu  
 195 200 205  
 Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala  
 210 215 220  
 Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys  
 225 230 235 240  
 Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln  
 245 250

5

<210> 12

<211> 262

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 12

ES 2 363 182 T3

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys  
 20 25 30  
 Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Pro Gln Asn  
 35 40 45  
 Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Ala  
 50 55 60  
 Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr  
 85 90 95  
 Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asn His Ser  
 100 105 110  
 Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Thr  
 115 120 125  
 Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly  
 130 135 140  
 Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala Glu Tyr His  
 145 150 155 160  
 Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser  
 165 170 175  
 Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys  
 180 185 190  
 Thr Leu Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala Asp  
 195 200 205  
 Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu  
 210 215 220  
 Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu  
 225 230 235 240  
 Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile  
 245 250 255  
 Gly Ile Ala Gly Lys Gln  
 260

## REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica acuosa que, después de la administración a un sujeto, puede inducir una respuesta inmunitaria que es (a) bactericida contra al menos el serogrupo W135 de *N. meningitidis* y (b) protectora contra enfermedad por *H. influenzae* de tipo b, en la que la composición comprende:
- 5 (i) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo W135; y
- (ii) un antígeno de sacárido capsular conjugado de *H. influenzae* de tipo b ('Hib');
- y en la que el sacárido del serogrupo W135 está conjugado con un toxoide diftérico.
2. Una composición inmunogénica acuosa que, después de la administración a un sujeto, puede inducir una respuesta inmunitaria que es (a) bactericida contra al menos el serogrupo W135 de *N. meningitidis* y (b) protectora contra enfermedad por *H. influenzae* de tipo b, en la que la composición comprende:
- 10 (i) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo W135; y
- (ii) un antígeno de sacárido capsular Hib conjugado;
- y en la que el sacárido del serogrupo W135 está conjugado con un toxoide tetánico.
3. Una composición inmunogénica acuosa que, después de la administración a un sujeto, puede inducir una respuesta inmunitaria que es (a) bactericida contra al menos el serogrupo W135 de *N. meningitidis* y (b) protectora contra enfermedad por *H. influenzae* de tipo b, en la que la composición comprende:
- 15 (i) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo W135; y
- (ii) un antígeno de sacárido capsular Hib conjugado;
- y en la que el sacárido del serogrupo W135 está conjugado con una proteína D de *H. influenzae*.
4. Una composición inmunogénica acuosa que, después de la administración a un sujeto, puede inducir una respuesta inmunitaria que es (a) bactericida contra al menos el serogrupo W135 de *N. meningitidis* y (b) protectora contra enfermedad por *H. influenzae* de tipo b, en la que la composición comprende:
- 20 (i) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo W135; y
- (ii) un antígeno de sacárido capsular Hib conjugado;
- 25 y en la que el sacárido Hib está conjugado con un toxoide tetánico.
5. Una composición inmunogénica acuosa que, después de la administración a un sujeto, puede inducir una respuesta inmunitaria que es (a) bactericida contra al menos el serogrupo W135 de *N. meningitidis* y (b) protectora contra enfermedad por *H. influenzae* de tipo b, en la que la composición comprende:
- 30 (i) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo W135; y
- (ii) un antígeno de sacárido capsular Hib conjugado;
- y en la que la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio.
6. Una composición inmunogénica acuosa que, después de la administración a un sujeto, puede inducir una respuesta inmunitaria que es (a) bactericida contra al menos el serogrupo W135 de *N. meningitidis* y (b) protectora contra enfermedad por *H. influenzae* de tipo b, en la que la composición comprende:
- 35 (i) un antígeno de sacárido capsular conjugado del serogrupo W135; y
- (ii) un antígeno de sacárido capsular Hib conjugado;
- y en la que el sacárido del serogrupo W135 está conjugado con un mutante de la toxina diftérica CRM<sub>197</sub> y la composición comprende  $\leq 30$   $\mu\text{g}$  de sacárido meningocócico por dosis.
7. La composición de cualquier reivindicación precedente que comprende además antígenos de sacáridos capsulares conjugados de los serogrupos C e Y y, opcionalmente, A.
- 40 8. La composición de cualquier reivindicación precedente que comprende además uno o más antígenos de polipéptidos del serogrupo B de *N. meningitidis*.
9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la composición consiste esencialmente en (i), (ii) y antígenos de sacáridos capsulares conjugados de los serogrupos C e Y y, opcionalmente, A.



10. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que el sacárido del serogrupo W135 tiene un grado de polimerización inferior a 30.
- 5 11. La composición de cualquier reivindicación precedente cuando depende de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que el sacárido del serogrupo W135 está conjugado con un toxoide diftérico, un toxoide tetánico o un mutante de la toxina diftérica CRM<sub>197</sub>.
12. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la misma proteína portadora se usa para todos los serogrupos.
13. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que el sacárido del serogrupo W135 tiene una relación de sacárido:proteína (peso/peso) entre 1:5 y 5:1.
- 10 14. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que el sacárido del serogrupo W135 está conjugado mediante un conector.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el sacárido del serogrupo W135 está conjugado directamente.
- 15 16. La composición de cualquier reivindicación precedente cuando depende de una de las reivindicaciones 1-3 ó 5-6, en la que el sacárido Hib está conjugado con mutante de la toxina diftérica CRM<sub>197</sub>, un toxoide tetánico o un complejo de la membrana externa de *N. meningitidis*.
17. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición comprende un adyuvante.
18. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición no incluye un adyuvante de hidróxido de aluminio.
- 20 19. La composición de cualquier reivindicación precedente cuando depende de una de las reivindicaciones 1-4 ó 6, en la que la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio.
20. La composición de la reivindicación 5 ó 19, en la que el antígeno Hib está adsorbido a fosfato de aluminio.
21. La composición de la reivindicación 5 ó 19, en la que el antígeno Hib no está adsorbido a fosfato de aluminio.
22. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que el antígeno Hib está inicialmente liofilizado.
- 25 23. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la administración del antígeno Hib produce una concentración de anticuerpo anti-fosfato de polirribosilribitol de  $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ .
24. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que los conjugados tienen una relación de sacárido:proteína (peso/peso) de entre 1:5 y 5:1.