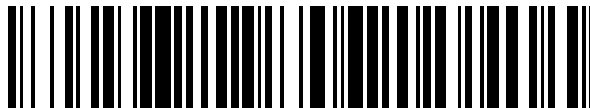


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 852**

51 Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)
B01D 61/14 (2006.01)
C12R 1/36 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04744126 .6**
96 Fecha de presentación: **15.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1644035**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54 Título: **ULTRAFILTRACIÓN Y ULTRACENTRIFUGACIÓN PARA PREPARAR VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.**

30 Prioridad:
15.07.2003 GB 0316560

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2011

73 Titular/es:
**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
VIA FIORENTINA 1
53100 SIENA SI, IT**

72 Inventor/es:
**Olivieri, Roberto;
Sabbatini, Fabio y
Marsili, Ilio**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 852 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

Ultrafiltración y ultracentrifugación para preparar vesículas de membrana externa

Campo técnico

La presente invención pertenece al campo de la preparación de vesículas a efectos de inmunización.

5 **Antecedentes de la técnica**

Una de las diversas maneras de enfocar la inmunización contra *N. meningitidis* consiste en usar vesículas de membrana externa (VME). El Instituto Nacional de Salud Pública de Noruega [p.ej.: Ref. 1] ha producido una eficaz vacuna de VME contra el serogrupo B, pero aunque se trata de una vacuna segura que previene la enfermedad de NmB, su eficacia se limita a la cepa usada para elaborar la vacuna.

10 La vacuna "RIVM" se basa en vesículas que contienen seis subtipos diferentes de PorA y ha probado ser inmunógena en niños en ensayos clínicos en fase II [2].

15 Las Referencias 3 y 4 revelan una vacuna contra diferentes serotipos patógenos de meningococo de serogrupo basada en VME que conservan un complejo proteico de 65 kDa. La Referencia 5 revela una vacuna que comprende VME de cepas meningocócicas diseñadas genéticamente, VME que comprenden al menos una proteína de la membrana externa de clase 1 (PME) pero que no comprenden ninguna PME de clase 2/3. La Referencia 6 revela VME que comprenden PME que tienen mutaciones en sus bucles superficiales. La Referencia 7 revela composiciones que comprenden VME complementadas con proteínas de unión a la transferrina (p.ej., TbpA y TbpB) y/o superóxido dismutasa de Cu, Zn. La Referencia 8 revela composiciones que comprenden VME complementadas con diversas proteínas. Las Referencias 9 y 10 también describen preparaciones de VME de meningococo.

20 La Referencia 11 revela un procedimiento para preparar vacunas basadas en VME, particularmente, para meningococo del serogrupo A, que comprenden las 10 siguientes etapas: (a) cultivar células bacterianas; (b) concentrar las células cultivadas de la etapa (a); (c) tratar las células con un detergente de sales de ácido biliar a un pH suficientemente alto para que no precipite el detergente, para desactivar las bacterias, afectar a la membrana externa de las bacterias y formar vesículas de membrana externa de las bacterias, vesículas que comprenden componentes de la membrana externa principalmente presentes en su forma nativa; (d) centrifugar la composición de la etapa (c) a 10.000–20.000 xg durante aproximadamente 1 a 2 horas para separar las vesículas de membrana externa de las células tratadas y de los residuos celulares, y recoger el sobrenadante; (e) realizar una centrifugación de alta velocidad del sobrenadante de la etapa (d) y recoger las vesículas de membrana externa en un sedimento; (f) volver a dispersar el sedimento de la etapa (e) en un tampón agitando a temperatura ambiente; (g) realizar una segunda centrifugación de alta velocidad según la etapa (e), recoger las vesículas de membrana externa en un sedimento; (h) volver a dispersar el sedimento de la etapa (g) en un medio acuoso que contiene un agente estabilizador agitando a temperatura ambiente; (i) realizar una filtración estéril por etapas a través de al menos dos filtros de tamaño de poro decreciente de la composición redispersada de la etapa (h), acabando con un filtro de tamaño de poro de aproximadamente 0,2 µm; y (j) opcionalmente, incluir la composición de la etapa (i) en un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o una composición adyuvante.

35 El documento US 2003/0059444-A revela la sustitución de una secuencia de etapas de ultracentrifugación mediante cromatografía de intercambio iónico y ultrafiltración.

40 Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento mejorado para preparar VME para su uso en vacunas, en concreto, un procedimiento que pueda preparar una cantidad mayor de VME en menor tiempo y, particularmente, un procedimiento adecuado para su uso a escala industrial.

Revelación de la invención

45 La invención se basa en descubrir que, en comparación con la centrifugación usada en la etapa (e) del procedimiento de la Referencia 11, la ultrafiltración permite el procesamiento de cantidades mucho mayores de sobrenadante que contiene VME en mucho menor tiempo (comúnmente, > 15 litros en 4 horas, en comparación con < 1,5 litros en 10 horas). Además, si se permite realizar la etapa (e) más rápidamente, el uso de la ultrafiltración permite omitir la etapa (f), porque las VME permanecen en suspensión.

50 Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para preparar VME bacterianas según la reivindicación 1 que comprende una etapa de ultrafiltración. La etapa de ultrafiltración se realiza en una suspensión acuosa de VME crudas tras su preparación a partir de bacterias, y las VME permanecen en suspensión tras la etapa de ultrafiltración.

Etapas de ultrafiltración

5 La ultrafiltración es un procedimiento de separación mediante el que se elimina el disolvente de una solución (incluyendo una solución coloidal) o de una suspensión, haciéndola fluir a través de una membrana mediante la aplicación de una presión hidráulica. Los componentes de la solución que son significativamente mayores que el disolvente no pueden pasar a través de la membrana. Por consiguiente, la ultrafiltración separa los componentes en base a su tamaño.

10 La etapa de ultrafiltración produce preferiblemente la diafiltración de la solución. En la diafiltración, el disolvente y/o los microsolutos (p.ej., sales) que se retiran durante la ultrafiltración son reemplazados por disolvente y microsolutos nuevos. En general, la extracción y la sustitución tienen lugar a la misma velocidad y, por tanto, el volumen de la solución se mantiene constante. El efecto global del procedimiento es, por tanto, la sustitución del disolvente/de los microsolutos originales por nuevos disolvente/ microsolutos. El procedimiento de la invención puede entonces incluir una etapa de diafiltración.

15 La ultrafiltración es preferiblemente una ultrafiltración de flujo cruzado o flujo tangencial, en la que la solución fluye sustancialmente en paralelo a la superficie de la membrana en lugar de fluir perpendicularmente a la superficie como ocurre en la filtración normal.

Las membranas preferidas para su uso en la etapa de ultrafiltración tienen un corte de aproximadamente 300 kDa.

Preferiblemente, la etapa de ultrafiltración dura menos de 10 horas, p.ej., entre 2 y 6 horas, preferiblemente, entre 3 y 5 horas, p.ej., entre 3,5 y 4,5 horas.

Las membranas pueden ser de cualquier material adecuado, p.ej., poliétersulfona.

20 *Etapas anteriores a la ultrafiltración*

25 Antes de la etapa de ultrafiltración, el procedimiento de la invención comprenderá comúnmente una etapa inicial de cultivo de células bacterianas (p.ej., en caldo o en cultivo de medio sólido), opcionalmente, seguida por una etapa de recogida y/o concentración de las células cultivadas (p.ej., mediante filtración o mediante centrifugación de baja velocidad para sedimentar las células). Sin embargo, la invención se puede realizar en bacterias que ya hayan sido cultivadas y/o cosechadas por separado. El cultivo bacteriano implica preferiblemente que no se usen ni productos sanguíneos ni material contaminado con un agente de la encefalopatía espongiforme transmisible.

30 La etapa de ultrafiltración se realiza en una suspensión acuosa de VME crudas una vez preparadas a partir de bacterias. Por lo tanto, antes de la ultrafiltración, el procedimiento puede comprender una etapa de preparación de VME en la que se tratan las células para afectar a sus membranas externas. La preparación de las VME de meningococo es ampliamente conocida en la técnica. Los procedimientos para obtener preparaciones adecuadas se revelan, por ejemplo, en las Referencias 1 a 25. Las técnicas para formar VME incluyen tratar bacterias con un detergente de sales de ácido biliar (p.ej., sales de ácido litocólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido ursocólico, etc., siendo el desoxicolato de sodio [26 y 27] preferido para tratar *Neisseria*) a un pH suficientemente elevado para no hacer precipitar el detergente [11]. Se pueden realizar otras técnicas sustancialmente en ausencia de detergente [28] usando técnicas tales como el tratamiento con ultrasonidos, la homogenización, la microfluidificación, la cavitación, el choque osmótico, la trituración, la prensa francesa, el mezclado, etc.

40 Para conservar la configuración nativa de las proteínas y de otros antígenos lábiles de la membrana externa, en general, se seleccionarán condiciones suaves para la preparación de las VME. Por tanto, es preferible evitar la desactivación térmica de las bacterias (p.ej., a 56°C o más), como lo es la desnaturalización del disolvente.

Etapas posteriores a la ultrafiltración

Tras la etapa de ultrafiltración, se siguen tratando las VME.

45 Por ejemplo, las VME se pueden esterilizar. La esterilización es preferiblemente una etapa final antes de su envasado como compuesto farmacéutico y se puede realizar convenientemente mediante una esterilización de filtración. Aunque las VME pasarán a través de filtros estándar de 0,22 µm, éstos se pueden obstruir rápidamente con otro material y, por tanto, es preferible realizar etapas consecutivas de esterilización de filtración a través de una serie de filtros de tamaño de poro decreciente, acabando con un filtro de esterilización estándar (p.ej., un filtro de 0,22 µm). Los ejemplos de los filtros anteriores serían aquéllos con un tamaño de poro de 0,8 µm, 0,45 µm etc. La esterilización de filtración tiene lugar ventajosamente a temperatura ambiente o superior, en lugar de a temperaturas de refrigeración. La flexibilidad de las vesículas es superior a temperatura ambiente y, por tanto, las vesículas de mayor tamaño (~0,2 µm) pueden pasar a través de un filtro de 0,22 µm más fácilmente, obstruyendo los filtros en menor medida.

Las VME se centrifugan (p.ej., se ultracentrifugan) una vez realizada la ultrafiltración. Por tanto, la invención no sustituye completamente el uso de la ultracentrifugación durante la preparación de las VME, sino que elimina al menos una etapa de ultracentrifugación relativa a la Ref. 11. Una etapa de ultracentrifugación normal requiere aproximadamente 13 horas para 1,3 litros de suspensión de VME, y por tanto un volumen mayor de VME requiere un gran recurso de ultracentrifugación. La ultrafiltración según la invención se puede usar para reducir el volumen que ha de ser ultracentrifugado (alrededor tres veces menor) y por tanto puede mejorar el rendimiento incluso aunque no se evite completamente la ultracentrifugación.

Las VME se pueden combinar con vehículos farmacéuticos y/o adyuvantes y/o estabilizadores. Por ejemplo, se vuelven a suspender el o los sedimentos de la ultracentrifugación (p.ej., en una solución de sacarosa, preferiblemente, de sacarosa al aproximadamente 3%) y luego se pueden someter a una esterilización de filtración según lo descrito anteriormente.

Las VME se pueden someter a un tratamiento de ultrasonidos. El tratamiento de ultrasonidos es particularmente útil entre la resuspensión de los sedimentos de la centrifugación y la esterilización.

Tras la resuspensión, las preparaciones de VME contienen preferiblemente entre 500 y 2.000 mg de proteína por mililitro, p.ej., entre 900 y 1.800 mg/ml o 1.000 ± 100 mg/ml.

Procedimiento global para preparar VME estériles

Por lo tanto, en general, el procedimiento de la invención incluirá las siguientes etapas: (1) cultivar células bacterianas; (2) recoger las células cultivadas; (3) formar las VME; (4) separar las VME de los residuos celulares para dar una suspensión acuosa de VME; (5) ultrafiltrar; (6) centrifugar y volver a suspender para recoger las VME purificadas; y (7) esterilizar. Es posible ajustar el pH en cualquier etapa según sea necesario. De igual manera, se puede usar la dilución según proceda.

La etapa (5) de este procedimiento sustituye las etapas (e) y (f) de la Referencia 11.

La bacteria

La bacteria de la que se preparan las VME es Gram negativa. La bacteria puede ser de cualquier género adecuado, incluyendo *Moraxella* (p.ej., *M. catarrhalis* [29,30]), *Shigella* (p.ej., *S. flexneri* [31,32]), *Pseudomonas* (p.ej., *P. aeruginosa* [31,32]), *Treponema* (p.ej., *T. pallidum* [33]), *Haemophilus* (p.ej., *H. influenzae* [9 y 10]), *Porphyromonas* (p.ej., *P. gingivalis* [34]) o *Helicobacter* (p.ej., *H. pylori* [35]), pero preferiblemente es del género *Neisseria*. Las especies de *Neisseria* preferidas son *N. meningitidis*, *N. lactamica* [36] y *N. gonorrhoeae* [37 y 38]. Dentro de *N. meningitidis*, se puede usar cualquiera de los serogrupos A, C, W135 e Y, pero es preferible preparar las vesículas del serogrupo B.

Las cepas preferidas del serogrupo B son MC58, 2996, H4476, 394/98 y la cepa de Nueva Zelanda 98/254. Sin embargo, los mejores serotipos y cepas que se pueden usar dependerán de las cepas extendidas en una determinada zona geográfica. Por ejemplo, el meningococo puede ser de cualquier serotipo (p.ej., 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16, etc.), de cualquier serosubtipo (P1.2; P1.4; P1.5; P1.5.2; P1.7,16; P1.7,16b; P1.9; P1.9,15; P1.12,13; P1.13; P1.14; P1.15; P1.21,16; P1.22,14; etc.) y de cualquier inmunotipo (p.ej., L1; L3,3,7; L10; etc.), y las cepas preferidas incluyen: (a) B:4:P1.4; (b) B:4:P1.15; (c) B:15:P1.7,16; y (d) B:4:P1.7b,4. El meningococo puede ser de cualquier linaje adecuado, incluyendo linajes hiperinvasores e hipervirulentos, p.ej., cualquiera de los siete siguientes linajes hipervirulentos: subgrupo I; subgrupo III; subgrupo IV-1; complejo ET-5; complejo ET-37; grupo A4; linaje 3. Estos linajes se han definido mediante electroforesis enzimática multilocus (MLEE), pero también se ha usado la tipificación de secuencias multilocus (MLST) para clasificar los meningococos [Ref. 39], p.ej., el complejo ET-37 es el complejo ST-11 según MLST, el complejo ET-5 es el ST-32 (ET-5), el linaje 3 es ST-41/44, etc.

Para reducir la actividad pirogénica, es preferible que la bacteria tenga bajos niveles de endotoxina (LPS). Se conocen bacterias mutantes adecuadas, p.ej., *Neisseria* mutante [40] y *Helicobacter* mutante [41]. Los procedimientos para preparar membranas externas sin LPS de bacterias Gram negativas se revelan en la Referencia 42.

La bacteria puede ser una bacteria de tipo natural o puede ser una bacteria recombinante. Las bacterias recombinantes preferidas sobreexpresan (en comparación con la cepa de tipo natural correspondiente) inmunógenos tales como NspA, proteína 287 [8], proteína 741 [8], TbpA, TbpB, superóxido dismutasa [7], etc. La bacteria puede expresar más de una proteína de membrana externa de clase I PorA p.ej., 2, 3, 4, 5 ó 6 de los subtipos de PorA: P1.7,16; P1.5,2; P1.19,15; P1.5c, 10; P1.12,13; y P 1.7h,4 [p.ej., Ref 12 y 14].

Otras bacterias recombinantes que se pueden usar con la invención tienen una o más mutaciones para disminuir (o, preferiblemente, noquear) la expresión de determinados productos génicos. Los genes preferidos para infrarregular y/o noquear incluyen: (a) Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PilC,

5 PorA, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA y/o TbpB [9]; | (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, PorA, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA y/o TbpB [10]; (c) transglicosilasa lítica | NMB0033 [43]; (d) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, GalE, LbpA, LpbB, Opa, Opc, PilC, PorA, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA y/o TbpB [44]; y (e) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, OpA, OpC, PilC, PorA, PorB, SiaD, SynA, SynB y/o SynC [45].

Composiciones farmacéuticas

Para un uso humano, generalmente, las VME se combinarán con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico, tal como anticuerpos o un polipéptido, genes y otros agentes terapéuticos. La expresión se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que no induzca por sí mismo a la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición, y que pueda ser administrado sin producir una toxicidad indebida. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas de gran tamaño, lentamente metabolizadas tales como, proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas víricas inactivas. Tales vehículos son ampliamente conocidos por aquéllos expertos habituales en la técnica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables de composiciones terapéuticas pueden incluir líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Las sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, y similares, también pueden estar presentes en tales vehículos. Comúnmente, las composiciones terapéuticas se preparan como inyectables, bien como soluciones líquidas o como suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para una solución en, o una suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. Los liposomas se incluyen en la definición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden estar presentes en la composición farmacéutica, p.ej., sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. En la Referencia 46, se encuentra una descripción minuciosa de los excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición incluirá comúnmente una solución salina.

25 Una vez formuladas, las composiciones se pueden administrar directamente a un sujeto. En general, la administración se realizará mediante inyección parenteral (p.ej., subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscularmente, o en el espacio intersticial de un tejido) o por vía mucosa (p.ej., oral, pulmonar, rectal, vaginal, intranasal [47,48]) etc.). También se pueden usar aplicaciones transdérmicas, agujas, pistolas de genes o inyectores de presión. La inyección intramuscular es la manera de administración preferida.

La dosis y el medio de administración de las composiciones farmacéuticas de la invención se determinan en base a cualidades específicas de la composición terapéutica, del estado, de la edad, del peso del paciente, la progresión de la enfermedad y otros factores relevantes.

35 Las infecciones por *Neisseria* afectan a diversas zonas del cuerpo y, por tanto, las composiciones de la invención se pueden preparar en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para una disolución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección (p.ej., una composición liofilizada). La composición se puede preparar para una administración tópica, p.ej., en forma de pomada, crema o polvo. La composición se puede preparar para una administración oral, p.ej., en forma de comprimido o cápsula, o en forma de jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición se puede preparar para una administración pulmonar, p.ej., en forma de inhalador, usando un polvo fino o un pulverizado. La composición se puede preparar en forma de supositorio o pesario. La composición se puede preparar para una administración nasal, aural u ocular, p.ej., en forma de gotas.

45 Las VME preparadas según el procedimiento de la invención se pueden combinar con un adyuvante. Los adyuvantes preferidos para aumentar la eficacia de la composición incluyen, pero no se limitan a: (A) MF59 (escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5%, formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidificador) [véase el Capítulo 10 de la Ref. 49; véase también la Ref. 50]; (B) micropartículas (i.e. una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferiblemente de ~200 nm a ~30 µm de diámetro, y lo más preferible de ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (p.ej., un ácido poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxiácido, un poliéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), prefiriéndose el copolímero de láctido y glicólido, opcionalmente, tratado para que tenga una superficie cargada negativamente (p.ej., con SDS) o una superficie cargada positivamente (p.ej., con un detergente catiónico, tal como CTAB) [51 y 52]; (C) liposomas [véanse los Capítulos 13 y 14 de la Ref. 49]; (D) ISCOM [véase el Capítulo 23 de la Ref. 49], que puede carecer de un detergente adicional [53]; (E) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero de bloques plurónicos al 5% L121 y thr-MDP, bien microfluidizado en una emulsión submicrométrica o sometido a movimientos vorticiales para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula [véase el Capítulo 12 de la Ref. 49]; (F) Sistema adyuvante Ribi™ (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 consiste en monofosforil lípido A (MPL), trehalosa-dimicolato (TDM) y un esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente, MPL + CWS (Detox™); (G) adyuvantes de saponina, tales como QuilA o QS21 [véase el Capítulo 22 de la Ref. 49], también conocido como Stimulon™; (H) quitosano [p.ej., 54]; (I) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (J) citocinas, tales como interleucinas (p.ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones p.ej., interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral, etc. [véanse los Capítulos 27 y 28 de la Ref. 49]; (K) una saponina (p.ej., QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [55]; (L) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) [p.ej., Capítulo 21 de la Ref. 49]; (M) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [56]; (N) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG [57] i.e. que contienen al menos un dinucleótido CG; (O) un polioxietiléneter o un polioxietilénéster [58]; (P) un tensioactivo de éster de sorbitán polioxietilénado en combinación con un octoxinol [59] o un tensioactivo de polioxietilénalquiléter o polioxietilénalquiléster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico más tal como octoxinol [60]; (Q) un oligonucleótido inmunoestimulante (p.ej., un oligonucleótido CpG) y una saponina [61]; (R) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica [62]; (S) una saponina y una emulsión de aceite en agua [63]; (T) una enterotoxina lábil al calor de *E.coli* ("LT") o mutantes desintoxicados de la misma, tales como los mutantes K63 o R72 [p.ej., Capítulo 5 de la Ref. 64]; (U) toxina del cólera ("CT") o mutantes desintoxicados de la misma [p.ej., Capítulo 5 de la Ref. 64]; (V) ARN bicatenario; (W) sales de aluminio, tales como hidróxidos de aluminio (incluyendo oxihidróxidos), fosfatos de aluminio (incluyendo hidroxifosfatos), sulfato de aluminio, etc. [Capítulos 8 y 9 de la Ref. 49]; (X) mimicos de monofosforil lípido A, tales como derivados de fosfato de aminoalquilglucosamina, p.ej., RC-529 [65]; (y) polifosfaceno (PCPP); (Z) un bioadhesivo [66] tal como microesferas de ácido hialurónico esterificado [67] o un mucoadhesivo seleccionado del grupo que consiste en derivados entrecruzados de ácido poli(acrílico), alcohol polivinílico, pirrolidona polivinílica, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También se pueden usar otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes [p.ej., véase el Capítulo 7 de la Ref. 49].

Las sales de aluminio son los adyuvantes preferidos para una inmunización parenteral. Las toxinas mutantes son los adyuvantes mucosos preferidos. El uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio es el más preferido, particularmente, para la inyección intramuscular, y este adyuvante se usa preferiblemente con un tampón de histidina [68].

La invención proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende las etapas de: (i) preparar VME según la invención y (ii) formular las VME como una composición farmacéutica. La etapa (ii) puede implicar actividades tales como filtración, adición de adyuvantes, adición de tampón, etc.

VME y composiciones basadas en VME preparadas usando el procedimiento

Las composiciones preparadas usando el procedimiento de la invención son, preferiblemente, composiciones inmunógenas, y más preferiblemente, composiciones de vacuna. Tales composiciones se pueden usar para aumentar las respuestas inmunes (p.ej., las respuestas de anticuerpos) en un mamífero (p.ej., en un ser humano, tal como un niño).

El pH de la composición es preferiblemente de entre 6 y 8, preferiblemente, de aproximadamente 7. El pH se puede mantener mediante el uso de un tampón. La composición puede ser estéril y/o estar libre de pirógenos. La composición puede ser isotónica con respecto a seres humanos. La composición puede o no incluir un conservante (p.ej., tiomersal, 2-fenoxietanol, etc.). Se prefieren las composiciones libres de mercurio.

La composición está preferiblemente libre de componentes derivados de la sangre. La composición está preferiblemente libre de agentes de la encefalopatía espongiiforme transmisible (p.ej., priones). La composición está preferiblemente sustancialmente libre de bacterias enteras y, en particular, de bacterias vivas.

La composición puede incluir material residual de la preparación de vesículas (p.ej., detergente, preferiblemente < 0,4 μg de detergente por μg de proteína de VME). La composición puede incluir azúcares solubles, p.ej., disacáridos tales como sacarosa y/o trehalosa. El contenido de LPS es preferiblemente < 0,2 μg por μg de proteína de VME.

Las composiciones se pueden distribuir en diversos recipientes, p.ej., viales o jeringas prellenadas. Se prefiere el uso de viales de vidrio. Estos recipientes serán generalmente estériles y estarán cerrados herméticamente. Cada recipiente incluye preferiblemente una sola dosis, p.ej., 0,5 ml de líquido. Los recipientes pueden estar envasados individualmente o en grupo, p.ej., una caja de 10 viales. Una vez envasadas, las composiciones de la invención se almacenan preferiblemente a entre 2°C y 8°C, pero no se deberían congelar.

Las vacunas pueden ser profilácticas (i.e., para evitar enfermedades) o terapéuticas (i.e., para reducir o eliminar los síntomas de una enfermedad).

Las composiciones para la administración a pacientes comprenderá una cantidad inmunológicamente eficaz de VME. Una "cantidad inmunológicamente eficaz" es una cantidad suficiente para ejercer una respuesta inmune en un paciente y, más preferiblemente, una respuesta inmune protectora en un paciente. La cantidad eficaz exacta para un paciente dependerá de su tamaño y salud, de la naturaleza y el grado de la afección, y de la composición terapéutica o de la combinación de composiciones terapéuticas seleccionadas para su administración. La cantidad eficaz para una situación dada se determina mediante la experimentación rutinaria y depende de la opinión del profesional clínico. A efectos de la presente invención, una cantidad inmunológicamente eficaz se administrará, generalmente, a una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg o aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg o aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de la composición de la invención en el individuo al que se administra. Una composición típica incluirá 50 µg/ml de proteína.

Además de los antígenos de VME, las composiciones pueden incluir uno o más de los siguientes antígenos adicionales:

- 15 – un antígeno de sacárido del serogrupo A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*, tal como el oligosacárido revelado en la Ref. 142 del serogrupo C [véase también la Ref. 69] o los oligosacáridos de la Ref. 146.
- antígenos de *Helicobacter pylori* tales como CatA [70 a 73], VacA [74, 75], NAP [76, 77, 78], HopX [p.ej., 79], HopY [p.ej., 79] y/o ureasa.
- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [p.ej., 80, 81, 82].
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como un virus desactivado [p.ej., 83, 84].
- 20 – un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como antígenos superficiales y/o del núcleo [p.ej., 84, 85].
- un antígeno del virus de la hepatitis C [p.ej., 86].
- un antígeno de difteria, tal un toxoide de la difteria [p.ej., Capítulo 3 de la Ref. 87].
- un antígeno de tétanos, tal como un toxoide del tétanos [p.ej., Capítulo 4 de la Ref. 87].
- 25 – un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente, también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [p.ej., Ref. 88 y 89]; también se puede usar el antígeno de pertusis de célula entera.
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B [p.ej., 69].
- antígeno(s) de la polio [p.ej., 90, 91], tales como OPV o, preferiblemente, IPV.
- un antígeno de *N. gonorrhoeae* [p.ej., 92, 93, 94, 95].
- 30 – un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [p.ej., Ref. 96 a 102].
- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [p.ej., 103].
- antígeno(s) de la rabia [p.ej., 104] tales como virus desactivado liofilizado [p.ej., 105, RabAvert™].
- antígenos del sarampión, paperas y/o rubeola [p.ej., Capítulos 9, 10 y Ref. 87].
- 35 – antígeno(s) de la gripe [p.ej., Capítulo 19 de la Ref. 87], tales como la hemaglutinina y/o las proteínas superficiales de la neuraminidasa.
- antígeno(s) del paramixovirus, tales como el virus respiratorio sincitial (RSV [106, 107]) y/o el virus paragripal (PIV3 [108]).
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [p.ej., 109].
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [p.ej., 110, 111, 112].
- 40 – un antígeno de *Staphylococcus aureus* [p.ej., 113].
- un antígeno de *Bacillus anthracis* [p.ej., 114, 115, 116].
- un antígeno de un virus de la familia flaviviridae (género flavivirus), tal como del virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, cuatro serotipos de los virus del dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus del Nilo occidental.

- un antígeno de pestivirus, tales como del virus de la fiebre porcina clásica, virus de la diarrea viral bovina y/o virus de la enfermedad de la frontera.
 - un antígeno de parvovirus, p.ej., del parvovirus B19.
 - una proteína priónica (p.ej., proteína priónica CJD).
- 5
- una proteína amiloide, tal como un péptido beta [117].
 - un antígeno del cáncer, tal como los enumerados en la Tabla 1 de la Ref. 118 o en las Tablas 3 y 4 de la Ref. 119.

Se prefiere la inclusión de más antígenos de *N. meningitidis*. En concreto, la composición puede incluir un antígeno de sacárido de uno o más (i.e., 1, 2, 3 ó 4) de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 y/o Y. Cuando se incluyen menos de 4 de estos serogrupos adicionales, es preferible incluir al menos el serogrupo C, p.ej., C+A+W135, C+A+Y, C+W135+Y.

10

Cuando se usa un antígeno de sacárido o de carbohidrato, está preferiblemente conjugado con una proteína transportadora para aumentar la inmunogenicidad [p.ej., Ref. 120 a 129]. Las proteínas transportadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoides de la difteria o del tétanos. Se prefiere particularmente el mutante de la toxina de la difteria CRM₁₉₇ [130]. Otros polipéptidos transportadores incluyen proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [131], péptidos sintéticos [132, 133], proteínas de choque térmico [134, 135], proteínas de pertussis [136, 137], proteína D de *H. influenzae* [138], citocinas [139], linfocinas [139], hormonas [139], factores de crecimiento [139], toxina A o B de *C. difficile* [140], proteínas de reabsorción de hierro [141], etc. Es posible conjugar diferentes sacáridos con el mismo tipo o un tipo diferente de proteína transportadora. Se puede usar cualquier reacción de conjugación adecuada con cualquier ligador adecuado cuando sea necesario. Para los conjugados meningocócicos [142–148], los vehículos preferidos son toroide de la difteria, CRM₁₉₇ y proteína D de *H. influenzae*.

15

20

Los antígenos de proteínas tóxicas se pueden desintoxicar cuando sea necesario, p.ej., desintoxicación de la toxina pertussis mediante procedimientos químicos y/o genéticos [89].

25 Cuando se incluye un antígeno de difteria en la composición, es preferible incluir también antígeno de tétanos y antígenos de pertussis. De igual manera, cuando se incluye un antígeno de tétanos, es preferible incluir también antígenos de difteria y pertussis. De igual manera, cuando se incluye un antígeno de pertussis, es preferible incluir también antígenos de difteria y tétanos. Por tanto, se prefieren las combinaciones de DTP.

Los antígenos de la composición estarán comúnmente 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 inmune contra ese antígeno.

30

Como alternativa al uso de antígenos proteicos en la composición de la invención, se puede usar un ácido nucleico que codifique el antígeno [p.ej., Ref. 149 a 157]. Por tanto, se pueden sustituir los componentes proteicos de las composiciones de la invención por ácido nucleico (preferiblemente, ADN, p.ej., en forma de un plásmido) que codifique a la proteína.

35

Procedimientos de tratamiento

La invención proporciona un procedimiento para generar una respuesta inmune en un paciente que comprende administrar una dosis inmunógena de VME de la invención al paciente. La respuesta inmune es preferiblemente protectora e implica preferiblemente anticuerpos y/o inmunidad mediada por células. El procedimiento puede generar una respuesta de refuerzo.

40

Preferiblemente, el paciente es un ser humano. Cuando la vacuna es para un uso profiláctico, el ser humano es preferiblemente un niño (p.ej., un bebé o un niño) o un adolescente; cuando la vacuna es para un uso terapéutico, el ser humano es preferiblemente un adolescente o un adulto. Las vacunas destinadas a los niños también se pueden administrar a adultos, p.ej., para evaluar la seguridad, la dosis, la inmunogenicidad, etc. El paciente tiene preferiblemente menos de 20 años, p.ej., 13–19 años, 8–12 años, 16–24 meses, 6–8 meses, 6 semanas–5 meses.

45

Las vacunas de la invención se administran preferiblemente mediante una inyección intramuscular. Las zonas típicas para la inyección incluyen el muslo superior o el brazo superior.

La invención también proporciona VME de la invención para su uso en medicina.

La invención también proporciona el uso de VME de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una infección meningocócica y/o meningitis bacteriana.

50

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

El tratamiento de dosificación puede ser un calendario de una sola dosis o un calendario de múltiples dosis. Se pueden usar múltiples dosis en un calendario de inmunizaciones primarias y/o en un calendario de inmunizaciones de refuerzo, p.ej., un calendario de inmunizaciones primarias puede implicar tres inyecciones con un intervalo de aproximadamente 6 semanas entre cada inyección. Un volumen típico para una sola dosis de líquido intramuscular es 0,5 ml.

Definición

El término "VME", como se usa en la presente memoria, incluye cualquier vesícula proteoliposómica obtenida mediante la alteración de una membrana externa bacteriana para formar vesículas de la membrana externa que incluyen componentes proteicos de la membrana externa. Las VME se preparan artificialmente a partir de bacterias (p.ej., mediante tratamiento con detergente) y, por tanto, se diferencian de las microvesículas (MV [158]) y las "VME nativas" ("VMEN" [48]), siendo ambas vesículas de membranas naturales que se forman espontáneamente durante el crecimiento bacteriano y se liberan en el medio de cultivo. Las MV se pueden obtener cultivando *Neisseria* en medio de cultivo de caldo, separando células enteras de pequeñas ampollas en el medio de cultivo de caldo y luego recogiendo las MV del medio sin células. Las cepas para su uso en la producción de MV, generalmente, se pueden seleccionar en base a la cantidad de MV producidas en cultivo, p. ej., Ref. 159 y 160 describen *Neisseria* con una alta producción de MV.

La expresión "que comprende" puede significar "que incluye", así como "que consiste en", p.ej., una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo más, p.ej., X + Y.

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

El término "sustancialmente" no excluye "completamente", p.ej., una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, el término "sustancialmente" se puede omitir de la definición de la invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un procedimiento que incluye dos etapas de ultracentrifugación sin ultrafiltración (no según la invención). La Figura 2 muestra un procedimiento en el que se ha sustituido una etapa de ultracentrifugación por una etapa de ultrafiltración.

Modos de llevar a cabo la invención

Ejemplo 1: VME de serogrupo meningocócico B (cepa noruega)

Se cultivó el serogrupo B de *N. meningitidis* (cepa 44/76, de Noruega) en ocho placas de "medio selectivo de meningococos" a 35°C en CO₂ al 5%/atmósfera de aire durante 24 horas. Se recogieron las células en 2 tubos con 12 ml de medio de Frantz. Se añadieron los contenidos de los tubos a 2 matraces de 500 ml que contenían medio de Frantz (150 ml) y se cultivaron con agitación durante 12 horas para obtener el crecimiento correcto para transferirlo a 2 matraces de 5.000 ml que contenían medio de Frantz (1.500 ml). Se cultivaron los matraces con agitación durante 12 horas más para producir un inóculo. Se añadió un matraz a un fermentador Chemap con una capacidad de 300 l que contenía 110 l de medio de Frantz pre-esterilizado y extracto de levadura sometido a diálisis esterilizado mediante filtración. El pH tras la inoculación fue de 7,1 y se mantuvo a 7,0 con NaOH 3N. Se realizó una fermentación por gasificación superficial controlando la cantidad de O₂ del aire y se aplicó un agitador y se cultivó durante 10 horas a 35°C. Se finalizó el crecimiento a una DO_{590nm} de 7,10, se enfrió el fermentador bajo 15°C, se redujo el suministro de aire y se siguió agitando a 100 rpm durante una noche.

Se realizó la transferencia de la suspensión bacteriana desde el fermentador por presión a una unidad de filtración de flujo cruzado CUF de Millipore dotada de válvulas, bombas y un módulo de filtración con 4 filtros de polietersulfona P2B300V05 Pellicon (corte a 300 kD). La transferencia inicial de la suspensión bacteriana de 30 l fue seguida por una concentración constante del volumen hasta que se vació el fermentador, y luego se realizó otra concentración más hasta dar un volumen de 5,5 l.

La concentración de la suspensión se realizó en una unidad CFF haciendo circular la suspensión para que pasara por los filtros, controlando continuamente una presión de la transmembrana y manteniéndola a menos de 50 kPa (valor observado: 50 kPa al final de la concentración).

Se ajustó el pH de la suspensión bacteriana concentrada de un pH 7,0 a 8,2, añadiendo, mediante un sistema de tubos, 5 l de tampón de Tris-HCl 0,1M de pH 9 con EDTA 10mM, y agitando después durante 15 min en la unidad CFF para garantizar condiciones uniformes.

Se inició la desactivación/extracción del material de la membrana externa (ME) añadiendo, mediante entubación, 500 ml de tampón de Tris-HCl 0,1M (pH 9) que contenía desoxicolato al 10% (DOC) para dar una concentración final del 0,5%. Posteriormente, se hizo circular la suspensión en la unidad CFF durante 30 min y la suspensión extraída (9,5 l), en la que se comprobó que no había ninguna bacteria viva, se drenó mediante un bombeo en la botella de 25 l.

En un primer experimento no según la invención (experimento A; Figura 1), se prepararon VME crudas mediante la distribución de la suspensión desactivada en tubos de centrifugación de 500 ml y la centrifugación en un centrifugador de Beckman a 9.000 rpm (16.650 xg) durante 1 hora a 4°C, recogiendo 8,5 l de sobrenadante. Se purificaron 1,35 l de VME crudas mediante dos ultracentrifugaciones posteriores a 19.000 rpm, 4°C, durante 13,6 horas y 6,8 horas respectivamente, recogiendo los sedimentos. Se suspendieron los sedimentos en 660 ml de sacarosa al 3% con una agitación magnética a temperatura ambiente hasta volverlos homogéneos, obteniéndose una concentración de material purificado de 1,52 g/l de proteína total.

En un segundo experimento (experimento B; Figura 2), se prepararon 3 l de VME crudas a partir de suspensión bacteriana usando una unidad de filtración de flujo cruzado CUF dotada de válvulas, bombas y un módulo de filtración con 1 filtro de polietersulfona P2B300V05 Pellicon (corte a 300 kD). La transferencia inicial de 1 l de VME crudas fue seguida de una concentración del volumen constante hasta acabar los 3 l y luego se sometió a una diafiltración añadiendo 5 l de tampón Tris-HCl 0,05M de pH 8,6 con EDTA 2mM, 1% de DOC y sacarosa al 20%. Se purificó el volumen retenido obtenido mediante ultracentrifugación a 19.000 rpm, 4°C, durante 6,8 horas, recogiendo los sedimentos. Se suspendieron los sedimentos en 1 l de sacarosa al 3% con una agitación magnética a temperatura ambiente hasta volverlos homogéneos, obteniéndose una concentración de material purificado de 0,85 g/l de proteína total en el material purificado.

Las purificaciones finales de VME obtenidas mediante tanto el experimento A como el B, tras una dilución con sacarosa al 3% de alrededor de 1,2 g/l de proteína total, se realizaron a 20°C filtrando a través de 3 filtros de cápsula (Gelman Science Suporlife DCF) consecutivos, primero prefiltros de 0,8 µm y 0,45 µm, respectivamente, y luego la filtración estéril final (0,22 µm), probando 836 ml de material purificado para el experimento A con una concentración proteica inicial de 1,1 mg/ml y 1 l del experimento B. Las concentraciones proteicas de las VME tras la filtración fueron de 0,12 mg/ml y 0,59 mg/ml, respectivamente.

Las VME se caracterizaron como se presenta a continuación:

	Experimento A	Experimento B	Especificación
Desoxicolato (µg/g de proteína)	1,5	0,4	0,1–0,4
ADN (µg/g de proteína)	0,004	0,004	< 0,035
Endotoxina (UI/g de proteína)	$2,8 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	$< 20 \times 10^3$
LPS (µg/g de proteína)	0,05	0,08	0,06–0,12
Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS			
80 kDa	1,7	2,2	1–4
70 kDa	11,8	12,7	1–12
clase I	24,6	25,1	22–32
clase III	34,8	32,8	30–43
clase IV	12,0	12,2	9–18
clase V	15,0	15,1	10–24

Por tanto, las VME preparadas usando ultrafiltración tienen una composición similar a las obtenidas mediante ultracentrifugación. Sin embargo, en comparación con el procedimiento de la técnica anterior, el procedimiento de la invención es mucho más sencillo y rápido.

Ejemplo 2: VME de serogrupo meningocócico B (cepa de Nueva Zelanda)

5 Se cultivó serogrupo B de *N. meningitidis* (cepa NZ 98/254, de Nueva Zelanda) como se explica anteriormente, a excepción de que: (a) se usó medio de Catlin en lugar de medio de Frantz; (b) los cultivos iniciales de 150 ml se desarrollaron hasta un nivel listo para transferirlo a un fermentador Chemap con una capacidad de 300 l, que contenía 120 l de medio previamente esterilizado; (c) el crecimiento en el fermentador Chemap duró 12 horas; (d) el crecimiento fue finalizado a DO_{590nm} de 5,90.

10 La transferencia del fermentador fue como la anterior, a excepción de que la concentración se realizó hasta un volumen de 5 l.

La concentración se realizó como se explica anteriormente.

El pH se ajustó como se explica anteriormente, a excepción de que: (a) el pH final fue de 8,6; (b) la cantidad de tampón Tris-HCl 0,1M añadida fue de 6 l.

15 La desactivación/extracción fue como se explica anteriormente, a excepción de que: (a) se añadieron 600 ml de tampón Tris-HCl; (b) el volumen de la suspensión extraída fue de 19,5 l.

La preparación de las VME crudas fue como se explica anteriormente, a excepción de que: (a) los tubos de centrifugación fueron de un volumen de 1.000 ml; (b) la centrifugación fue a 8.000 rpm (16.650 xg) para dar 17,5 l de sobrenadante.

20 La filtración de flujo cruzado para purificar las VME (en lugar de la centrifugación) fue como en el experimento B anterior, a excepción de que: (a) se usaron 17,5 l de VME crudas; (b) se usaron dos filtros de poliétersulfona P2B300V05 (corte a 300 kDa); (c) se usó una transferencia inicial de 4 l de VME crudas; (d) la diafiltración fue con 30 l de tampón Tris-HCl; (e) se volvieron a suspender los sedimentos en 1,2 l de sacarosa al 3%; (f) el material homogéneo se sometió además a ultrasonidos y dio una concentración final de material purificado de 1,5 g/l de proteína total.

25 La purificación final fue como se explica anteriormente, a excepción de que: (a) la filtración fue a través de dos filtros de cápsula (Sartoclean CA, Sartobran P) consecutivos, primero prefiltros de 0,8 + 0,68 µm, y luego una filtración estéril final de 0,45 + 0,22 µm. La concentración proteica de las VME tras la filtración fue de 1,0 mg/ml.

Las VME se caracterizaron como se presenta a continuación:

	Ejemplo 2	Especificación
Desoxicolato (µg/g de proteína)	0,4	0,1–0,4
ADN (µg/g de proteína)	0,0005	< 0,035
Endotoxina (UI/g de proteína)	5393	< 20 x 10 ³
LPS (µg/g de proteína)	0,010	0,06–0,12
Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS		
80 kDa	3,8	1–4
70 kDa	6,4	1–12
clase I	18,7	22–32
clase III + FbpA	31,3	30–43
clase IV	10,7	9–18
clase V	2,7	10–24
NspA	3,9	1–7

Por tanto, el procedimiento de producción proporcionó VME con un mosaico de antígenos nativos y un nivel muy reducido de LPS. Sin embargo, en comparación con el procedimiento de la técnica anterior en el que se usan dos etapas de ultracentrifugación, la invención es mucho más sencilla y rápida.

Ejemplo 3: VME de serogrupo meningocócico B (cepa de Nueva Zelanda)

5 Se prepararon VME crudas de la cepa 98/254 según lo descrito anteriormente. Se ajustó el pH hasta entre 7,5 y 9,0 (comúnmente, entre 8,3 y 8,5) con tampón, y luego se concentró hasta 20 litros mediante ultrafiltración durante entre 3,5 y 4,5 horas usando casetes de polisulfona Pellicon 2 de Millipore con una superficie de 3 m². Se sometió el material concentrado a una diafiltración frente a 7 volúmenes de una solución que contenía Tris-EDTA, DOC al 1% y sacarosa al 20% ("tampón B"), y luego con 3 volúmenes de "tampón B1" (igual que el "tampón B" pero sólo con DOC al 0,5%). Se volvió a concentrar el material retenido hasta 4 litros y se recogió. Se lavó el sistema de ultrafiltración con tampón B1. Luego se lavó el material retenido y se almacenaron las VME (material retenido + lavados) a 2–8°C. La carga bacteriana biológica del material final fue cero y el contenido de endotoxina fue < 0,05 UI/ml. El procedimiento demostró una excelente regularidad de lote a lote.

15 Se centrifugó el material almacenado en un ultracentrifugador Beckman Coulter Optima XL 100K usando un rotor de tipo 19 y botellas Beckman de 250 ml (220 ± 10 ml de material por botella), 19.000 rpm durante 408 minutos a 2–8°C. Se lavaron los sedimentos en 10 ml de una solución de sacarosa al 3% y luego se volvieron a suspender en sacarosa al 3% (volumen añadido de 60 ml) usando un agitador magnético de 700 rpm en botellas Beckman de 250 ml. Se sometió a ultrasonidos el material resuspendido durante 300 minutos a <20°C. Cuando fue necesario, se diluyó el material sometido a ultrasonidos con solución de sacarosa al 3% para dar una concentración de proteína final de 1,2 mg/ml. La carga bacteriana biológica del material final fue cero y el procedimiento demostró una excelente regularidad de lote a lote.

20 Se sometieron las VME a una etapa de filtración final, primero a través de filtros de 0,8–0,65 µm y luego a través de filtros de 0,22 µm. Se pasaron las VME sometidas a ultrasonidos a un recipiente de vidrio estéril con prefiltros de 0,2 m² y 0,8–0,65 µm Sartoclean CA. Esta prefiltración se realizó durante 5–6 minutos con una bomba peristáltica usando sólo un grupo de filtros. Luego se pasó el filtrado a un segundo recipiente de vidrio estéril con filtros de 0,4 m² y 0,45–0,22 µm Sartobran P. Esta filtración duró 7–10 minutos, de nuevo con bombas peristálticas. Primero se aclararon los prefiltros con 500–600 ml de sacarosa al 3% y se lavaron los filtros de 0,22 µm con 200 ml de sacarosa al 5% tras la filtración. Se almacenó el material de VME final a 2–8°C. Este material contenía < 0,16 µg de LPS por µg de proteína y < 0,4 µg de DOC por µg de proteína. La carga bacteriana biológica fue cero. El contenido de proteína de las VME fue de entre 800 µg/ml y 1.000 µg/ml.

REFERENCIAS (cuyos contenidos se encuentran incorporados en la presente memoria por referencia)

- [1] Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338(8775):1093–1096.
- 35 [2] de Kleijn *et al.* (2001) *Vaccine* 20:352–358.
- [3] Patente estadounidense n.º 5597572.
- [4] Patente estadounidense n.º 5747653.
- [5] Patente europea n.º 0449958.
- [6] Solicitud de patente europea n.º 0680512.
- 40 [7] WO00/25811.
- [8] WO01/52885.
- [9] WO01/09350.
- [10] WO02/09746.
- [11] WO01/91788.
- 45 [12] Claassen *et al.* (1996) *Vaccine* 14:1001–1008.
- [13] Cartwright *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2612–2619.

- [14] Peeters *et al.* (1996) *Vaccine* 14:1009–1015.
- [15] Fu *et al.* (1995) *Biotechnology NY* 12:170–174.
- [16] Fredriksen *et al.* páginas 818–824 de “Pathobiology and immunobiology of Neisseriaceae” (eds. Conde-Glez *et al.*) ISBN 968–6502–13–0.
- 5 [17] Davies *et al.* (1990) *J. Immunol.Meth.* 134:215–225.
- [18] Saunders *et al.* (1999) *Infect. Immun.* 67:113–119.
- [19] Draabick *et al.* (2000) *Vaccine* 18:160–172.
- [20] Moreno *et al.* (1985) *Infect. Immun.* 47:527–533.
- [21] Milagres *et al.* (1994) *Infect. Immun.* 62:4419–4424.
- 10 [22] Naess *et al.* (1998) *Infect. Immun.* 66:959–965.
- [23] Rosenqvist *et al.* (1998) *Dev.Biol.Stand.* 92:323–333.
- [24] Haneberg *et al.* (1998) *Infect. Immun.* 66:1334–1341.
- [25] Andersen *et al.* (1997) *Vaccine* 15:1225–1234.
- [26] Patente europea n.º 0011243.
- 15 [27] Fredriksen *et al.* (1991) *NIPH Ann.* 14(2):67–80.
- [28] WO2004/019977.
- [29] Patentes estadounidenses n.º 5.552.146; 5.981.213 y 5.993.826; véase también WO93/03761.
- [30] Zhou *et al.* (1998) *FEMS Microbiol Lett* 163:223–228.
- [31] Kadurugamuwa y Beveridge (1999) *Microbiology* 145:2051–2060.
- 20 [32] WO97/05899.
- [33] Blanco *et al.* (1999) *J Immunol* 163:2741–2746.
- [34] Kesavalu *et al.* (1992) *Infect. Immun.* 60:1455–1464.
- [35] Keenan *et al.* (1998) *FEMS Microbiol Lett* 161:21–27.
- [36] WO00/50074.
- 25 [37] Parmar *et al.* (1997) *Vaccine* 15:1641–1651.
- [38] WO99/59625.
- [39] Maiden *et al.* (1998) *PNAS USA* 95:3140–3145.
- [40] WO99/10497.
- [41] WO02/07763.
- 30 [42] Patente europea n.º 0624376.
- [43] Adu–Bobie *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:1914–1919.
- [44] WO 02/062378.
- [45] WO 2004/014417.
- [46] Gennaro (2000) “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”. XX ed. ISBN: 0683306472.
- 35 [47] Bakke *et al.* (2001) *Infect. Immun.* 69:5010–5015.
- [48] Katial *et al.* (2002) *Infect. Immun.* 70:702–707.

- [49] "Vaccine design: the subunit and adjuvant approach", eds. Powell & Newman, *Plenum Press* 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [50] WO90/14837.
- [51] WO02/26212.
- 5 [52] WO98/33487.
- [53] WO00/07621.
- [54] WO99/27960.
- [55] WO98/57659.
- [56] Solicitudes de patentes europeas n.º 0835318, 0735898 y 0761231.
- 10 [57] Krieg (2000) *Vaccine* 19:618-622; Krieg (2001) *Curr opin Mol Ther* 2001 3:15-24; WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581 etc.
- [58] WO99/52549.
- [59] WO01/21207.
- [60] WO01/21152.
- 15 [61] WO00/62800.
- [62] WO00/23105.
- [63] WO99/11241.
- [64] Del Giudice *et al.* (1998) "Molecular Aspects of Medicine", vol. 19, número 1.
- [65] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- 20 [66] WO00/50078.
- [67] Singh *et al.* (2001) *J. Cont. Rele.* 70:267-276.
- [68] WO03/009869.
- [69] Costantino *et al.* (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [70] Covacci y Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592.
- 25 [71] WO93/18150.
- [72] Covacci *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5791-5795.
- [73] Tummuru *et al.* (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809.
- [74] Marchetti *et al.* (1998) *Vaccine* 16:33-37.
- [75] Telford *et al.* (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.
- 30 [76] Evans *et al.* (1995) *Gene* 153:123-127.
- [77] WO96/01272 y WO96/01273, especialmente, SEC ID N.º 6.
- [78] WO97/25429.
- [79] WO98/04702.
- [80] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- 35 [81] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [82] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.

- [83] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187–1188.
- [84] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321–326.
- [85] Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Supl.: S63–68 y 79–80.
- [86] Hsu *et al.* (1999) *Clin Liver Dis* 3:901–915.
- 5 [87] “Vaccines” (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0–7216–1946–0.
- [88] Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349–355.
- [89] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232–238.
- [90] Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287–308.
- [91] Zimmerman y Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113–118, 125–126.
- 10 [92] WO99/24578.
- [93] WO99/36544.
- [94] WO99/57280.
- [95] WO02/079243.
- [96] WO02/02606.
- 15 [97] Kalman *et al.* (1999) *Nature Genetics* 21:385–389.
- [98] Read *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397–406.
- [99] Shirai *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181 (Supl 3): S524–S527.
- [100] WO99/27105.
- [101] WO00/27994.
- 20 [102] WO00/37494.
- [103] Ross *et al.* (2001) *Vaccine* 19:4135–4142.
- [104] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Supl: S2–6.
- [105] MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 16 de enero de 1998; 47(1):12, 19.
- [106] Anderson (2000) *Vaccine* 19, Supl I: S59–65.
- 25 [107] Kahn (2000) *Curr Opin Pediatr* 12:257–262.
- [108] Crowe (1995) *Vaccine* 13:415–421.
- [109] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl 1: S101–107.
- [110] WO02/34771.
- [111] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227–43, viii.
- 30 [112] Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98: 4658–4663.
- [113] Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357(9264):1225–1240; véanse también las páginas 1218–1219.
- [114] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85–100.
- [115] Demicheli *et al.* (1998) *Vaccine* 16:880–884.
- [116] Stepanov *et al.* (1996) *J Biotechnol* 44:155–160.
- 35 [117] Ingram (2001) *Trends Neurosci* 24:305–307.

- [118] Rosenberg (2001) *Nature* 411:380–384.
- [119] Moingeon (2001) *Vaccine* 19:1305–1326.
- [120] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195–196.
- [121] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Supl 2: S28–36.
- 5 [122] Buttery y Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163–168.
- [123] Ahmad y Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113–133, vii.
- [124] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563–567.
- [125] Patente europea n.º 0 477 508.
- [126] Patente estadounidense n.º 5.306.492.
- 10 [127] WO98/42721.
- [128] “Conjugate Vaccines” (eds. Cruse *et al.*) ISBN 3805549326, particularmente, el vol. 10:48–114.
- [129] Hermanson (1996) “Bioconjugate Techniques” ISBN: 0123423368 ó 012342335X.
- [130] Estudio de investigación, 453077 (Enero de 2002)
- [131] EP–A–0372501
- 15 [132] EP–A–0378881
- [133] EP–A–0427347
- [134] WO93/17712
- [135] WO94/03208
- [136] WO98/58668
- 20 [137] EP–A–0471177
- [138] WO00/56360
- [139] WO91/01146
- [140] WO00/61761
- [141] WO01/72337
- 25 [142] Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691–8.
- [143] Lieberman *et al.* (1996) *JAMA* 275:1499–503.
- [144] WO02/058737.
- [145] WO02/00249.
- [146] WO03/007985.
- 30 [147] Rennels *et al.* (2002) *Pediatr Infect Dis J* 21:978–979.
- [148] Campbell *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186:1848–1851.
- [149] Robinson y Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271–283.
- [150] Donnelly *et al.* (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617–648.
- [151] Scott–Taylor y Dalgleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471–480.
- 35 [152] Apostolopoulos y Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441–447.

[153] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116–120.

[154] Dubensky *et al.* (2000) *Mol Med* 6:723–732.

[155] Robinson y Pertner (2000) *Adv Virus Res* 55:1–74.

[156] Donnelly *et al.* (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190–193.

5

[157] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84–90.

[158] WO02/0964.

[159] Patente estadounidense n.º 6.180.111.

[160] WO01/34642.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un procedimiento para preparar vesículas de membrana externa (VME) bacterianas para su uso en vacunas que comprende las etapas de: (i) ultrafiltración realizada en una suspensión acuosa de VME crudas que ha sido preparada a partir de bacterias gram negativas, en la que las VME permanecen en suspensión tras la etapa de ultrafiltración; (ii) ultracentrifugación de la suspensión y (iii) resuspensión de las VME ultracentrifugadas de los sedimentos de la ultrafiltración.
- 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de ultrafiltración da como resultado una diafiltración.
- 3.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la ultrafiltración es de flujo cruzado o de flujo tangencial.
- 10 4.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la membrana usada para la ultrafiltración tiene un corte de aproximadamente 300 kDa.
- 5.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las VME son resuspendidas en la etapa (iii) en una solución de sacarosa.
- 15 6.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las VME se esterilizan tras la etapa (iii).
- 7.- El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la esterilización es mediante esterilización de filtración.
- 8.- Un procedimiento para preparar VME bacterianas para su uso en vacunas que comprende las etapas de: (a) cultivar las células bacterianas; (b) recoger y/o concentrar las células cultivadas; (c) perturbar las membranas externas de las células cultivadas; y (d) preparar VME mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 20 9.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además la etapa de combinar las VME con vehículos farmacéuticos y/o adyuvantes y/o estabilizador.
- 10.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la bacteria es *Neisseria meningitidis*.
- 25 11.- El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la bacteria es una *N. meningitidis* de serogrupo B.
- 12.- El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la bacteria es una cepa B:4:P1.4, una cepa B:4:P1.15, una cepa B:4:P1.19,15, una cepa B 4:P1.7b,4 o una cepa B:15:P1.7,16.
- 13.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la *N. meningitidis* tiene una o más mutaciones para disminuir o noquear la expresión de un producto génico.
- 30 14.- El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el producto génico es Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, ExbB, ExbD, FrpB, GalE, HtrB, MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, NMB0033, OpA, OpC, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, PorA, PorB, rmpM, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, SynA, SynB, SynC, TbpA y/o TbpB.

FIGURA 1

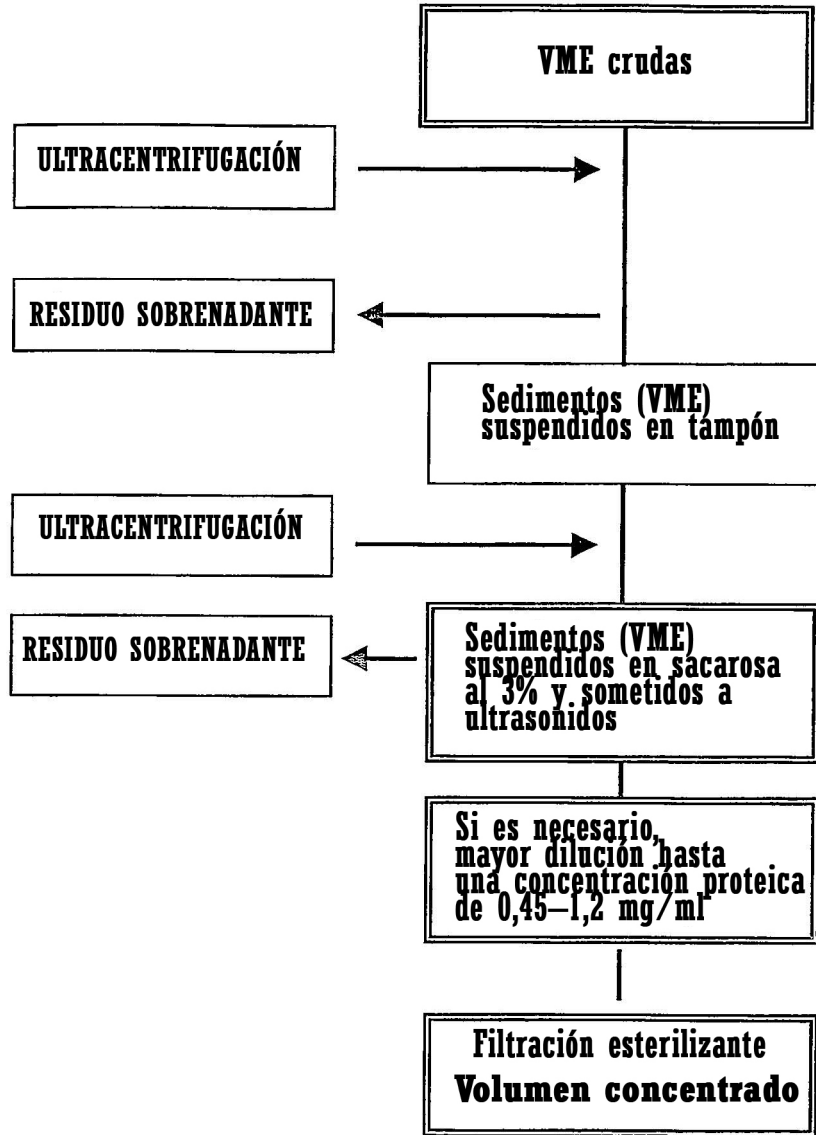


FIGURA 2

