

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 175**

51 Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04706762 .4**
96 Fecha de presentación: **30.01.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1587537**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54 Título: **Vacunas inyectables contra múltiples serogrupos de meningococos**

30 Prioridad:
30.01.2003 GB 0302217
02.10.2003 GB 0323101

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2012

73 Titular/es:
Novartis AG
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:
COSTANTINO, Paolo, Chiron S.r.l.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 383 175 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 inyectables contra múltiples serogrupos de meningococos

Campo técnico

La presente invención pertenece al campo de las vacunas, particularmente frente a la meningitis bacteriana.

5 Técnica antecedente

Neisseria meningitidis es un patógeno humano gramnegativo [1] que provoca meningitis bacteriana. Está estrechamente emparentado con *N. gonorrhoeae*, aunque una característica que diferencia claramente a los meningococos es la presencia de una cápsula de polisacáridos que está presente en todos los meningococos patógenos.

10 Basándonos en el polisacárido capsular de los organismos, se han identificado doce serogrupos de *N. meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y & Z). El serogrupo A ('MenA') es la causa más habitual de enfermedades epidémicas en el África subsahariana. Los serogrupos B & C son responsables de la mayoría de los casos en los países desarrollados, mientras que los casos restantes están causados por los serogrupos W135 & Y.

15 Al igual que se usa para la clasificación, el polisacáridos capsulares se han utilizado para la vacunación. Durante muchos años se ha conocido una vacuna tetravalente inyectable de polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, Y & W135 [2,3] y está autorizada para su uso en seres humanos. Aunque es eficaz en adolescentes y adultos, induce una respuesta inmunitaria pobre y de corta duración y protección, y no puede usarse en niños [por ejemplo, 4]. Los polisacáridos de esta vacuna no están conjugados y están presentes en una proporción ponderal de 1:1:1:1 [5]. Mencevax ACWY™ y Menomune™ contienen ambos 50 µg de cada polisacárido purificado una vez reconstituídos a partir de sus formas liofilizadas. Los sacáridos de la cápsula de los serogrupos A, C, W135 & Y también se han combinado en forma de conjugados [6-9] para dar vacunas tetravalentes, por ejemplo, el producto no coadyuvado Menactra™.

20 Los oligosacáridos conjugados del serogrupo C se han aprobado para su uso en seres humanos, incluyendo Menjugate™ [10,11], Meningitec™ y NeisVac-C™. Los productos Menjugate™ y Meningitec™ tienen antígenos de oligosacáridos conjugados con un portador CRM₁₉₇, mientras que NeisVac-C™ usa el polisacárido completo (des-O-acetilado) conjugado con un portador toxoide tetánico.

25 Permanece sin embargo, la necesidad de mejoras en las vacunas conjugadas frente a los serogrupos A, W 135 e Y, y en su elaboración. Esa necesidad es abordada por los productos, procesos y usos desvelados en la referencia 7, pero aún queda ámbito para modificaciones y mejoras adicionales.

30 Divulgación de la invención

35 La invención proporciona una composición inmunógena inyectable que comprende sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*, en la que (i) dichos sacáridos capsulares están conjugados con un portador proteico para dar conjugados individuales para cada uno de los cuatro serogrupos; (ii) los conjugados tienen una proporción sacárido:proteína (p/p) con un exceso de proteína; y (iii) la composición contiene entre 10 µg y 25 µg de sacáridos de meningococos por dosis. Dichas composiciones se definen en las reivindicaciones 1 y 7.

La invención también proporciona dicha composición inmunógena inyectable, en la que la composición comprende adicionalmente un antígeno de uno o más de: (a) serogrupo B de *N. meningitidis*; (b) *Haemophilus influenzae* de tipo B; y/o (c) *Streptococcus pneumoniae*.

Los antígenos incluidos en ocho composiciones preferidas de la invención son:

- 40 (1) serogrupos A, C, W135 & Y de *N. meningitidis*;
- (2) serogrupos A, B, C, W135 & Y de *N. meningitidis*; *H. influenzae* de tipo B y serogrupos A, C, W135 & Y de *N. meningitidis*;
- (4) *H. influenzae* de tipo B y serogrupos A, B, C W135 & Y de *N. meningitidis*;
- (5) *S. pneumoniae* y serogrupos A, C, W135 & Y de *N. meningitidis*;
- 45 (6) *S. pneumoniae* y serogrupos A, B, C, W135 & Y de *N. meningitidis*;
- (7) *H. influenzae* de tipo B, *S. pneumoniae* y serogrupos A, C, W135 & Y de *N. meningitidis*
- (8) *H. influenzae* de tipo B, *S. pneumoniae* y serogrupos A, B, C, W135 & Y de *N. meningitidis*.

Los antígenos de sacáridos de las composiciones de la invención son preferiblemente oligosacáridos. Los antígenos de sacáridos de las composiciones de la invención son muy preferiblemente oligosacáridos conjugados.

Mezclas de sacáridos de meningococos

Las composiciones de la invención comprenden sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*.

5 Se prefiere que la eficacia protectora de los antígenos sacáridos individuales no se elimine mediante su combinación, aunque puede reducirse la inmunogenicidad real (por ejemplo, los títulos de ELISA).

La proporción (p/p) de sacárido MenA:sacárido MenC puede ser mayor de 1 (por ejemplo 2:1, 3:1, 4:1 ó 5:1).

La proporción (p/p) de sacárido MenY:sacárido MenW135 puede ser mayor de 1 (por ejemplo 2:1, 3:1, 4:1 ó 5:1) y/o la proporción (p/p) de sacárido MenY:sacárido MenC - puede ser menor de 1 (por ejemplo 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o inferior).

10 Una cantidad típica de cada antígeno de sacáridos de meningococo por dosis es, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg, de aproximadamente 2,5 µg, de aproximadamente 4 µg, de aproximadamente 5 µg o de aproximadamente 10 µg (expresado como sacárido).

Las proporciones preferidas (p/p) para los sacáridos de los serogrupos A:C:W135:Y son: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 4: 2:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 2:2:1:2; y 2:2:2:1. Las proporciones preferidas (p/p) para los sacáridos de los serogrupos C:W135:Y son: 1:1: 1; 1:1:2; 1:1:1; 2:1:1; 4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1 y 2:1:1. Se prefiere usar una masa sustancialmente igual de cada sacárido.

Purificación de los polisacáridos capsulares

20 Los polisacáridos capsulares de los meningococos se preparan típicamente mediante un proceso que comprende las etapas de precipitación del polisacárido (por ejemplo, usando un detergente catiónico), fraccionamiento con etanol, extracción fría con fenol (para eliminar la proteína) y ultracentrifugación (para eliminar el LPS) [por ejemplo ref. 15].

25 Un proceso más preferido [7], implica sin embargo la precipitación del polisacárido seguido de una solubilización del polisacárido precipitado usando un alcohol inferior. La precipitación puede conseguirse usando un detergente catiónico tal como sales de tetrabutilamonio y de cetiltrimetilamonio (por ejemplo, las sales de bromuro), o bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio. Particularmente se prefiere el bromuro de cetiltrimetilamonio (*Cetyltrimethylammonium bromide*, 'CTAB') [16]. La solubilización del material precipitado puede conseguirse 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 se añade preferiblemente al polisacárido precipitado para dar una concentración final de etanol (basada en el contenido total de etanol y agua) de entre el 50% y el 95%.

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

35 Una vez filtrado para eliminar contaminantes, el polisacárido puede precipitarse para un tratamiento y/o procesado adicionales. Esto puede conseguirse convenientemente mediante el intercambio de cationes (por ejemplo, mediante la adición de sales de calcio o de sodio).

40 Como alternativa a la purificación, los sacáridos capsulares de la presente invención pueden obtenerse mediante una síntesis total o parcial, por ejemplo, la síntesis de Hib se desvela en la ref. 17, y la síntesis de MenA en la ref. 18.

El polisacárido puede modificarse químicamente. Por ejemplo, puede modificarse para sustituir uno o más grupos hidroxilo por grupos bloqueantes. Esto es particularmente útil para reducir la hidrólisis del serogrupo A [19] (véase a continuación). También puede realizarse una des-O-acetilación de los sacáridos.

45 Serogrupo B de *N. meningitidis*

Algunas composiciones de la invención incluyen un antígeno del serogrupo B de *N. meningitidis*. Al contrario que los serogrupos A, C, W135 e Y, el sacárido capsular de MenB no es adecuado para su uso como inmunógeno en seres humanos debido a su similitud con los antígenos propios. Si se va a usar un antígeno de sacárido de MenB, es necesario por lo tanto usar un sacárido modificado, tal como aquel en el que los grupos N-acetilo de los residuos de ácido siálico del sacárido se han sustituido por grupos N-acilo. Los grupos N-acilo adecuados son grupos acilo de C₁ a C₈, tales como N-propionilo [20]. En lugar de usar un antígeno de sacárido, se prefiere usar sin embargo un antígeno de polipéptido.

Por lo tanto, la composición puede incluir uno o más antígenos de polipéptidos que inducen una respuesta

inmunitaria que protege frente a la infección por MenB y/o que es bactericida frente a MenB. De forma más general, la composición puede inducir preferiblemente, tras su administración a un sujeto, una respuesta de anticuerpos en ese sujeto que es bactericida frente a dos o más (por ejemplo, 2 ó 3) de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y el linaje 3 del serogrupo B de *N. meningitidis*.

5 Se ha publicado la secuencia del genoma de la cepa MC58 de MenB [21] y los antígenos adecuados pueden elegirse de entre los polipéptidos codificados [22]. Los antígenos preferidos se desvelan en las referencias 22 a 32. En lugar de consistir en un único antígeno, se prefiere que la composición de la invención comprenda una mezcla de 10 o menos (por ejemplo 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) antígenos purificados, y particularmente se prefiere que la composición no incluya mezclas complejas o indefinidas de antígenos, por ejemplo, se prefiere no incluir vesículas de la
10 membrana exterior (*outer membrane vesicles*, OMV) en la composición.

Las composiciones preferidas incluyen uno o más de los siguientes cinco antígenos [32]: (1) una proteína 'NadA', preferiblemente en forma oligomérica (por ejemplo, en forma trimérica); (2) una proteína '741'; (3) una proteína '936'; (4) una proteína a '953'; y (5) una proteína '287'.

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

La 'NadA' (adhesina A de *Neisseria*) de MenB se desvela como la proteína '961' en la referencia 25 (ID. SEC. 2943 & 2944) y como 'NMB1994' en la referencia 21 (véanse también los números de acceso del GenBank: 11352904 & 7227256). Puede encontrarse un estudio detallado de la proteína en la referencia 33. Cuando se usa según la presente invención, la NadA puede tomar varias formas. Las formas preferidas de NadA son variantes por
25 truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 29 a 31. En particular, se prefiere la NadA sin su anclaje de membrana C-terminal (por ejemplo, delección de los residuos 351-405 para la cepa 2996, para dar la ID. SEC. N°: 1 de este documento), que a menudo se distingue en este documento por el uso de un superíndice 'C', por ejemplo, NadA^(C). La expresión de NadA sin su dominio de anclaje a la membrana en *E. coli* da como resultado la secreción de la proteína en el sobrenadante del cultivo con la eliminación concomitante de su péptido líder 23mer (por ejemplo, para dejar un 327mer para la cepa 2996 [ID. SEC. N°: 2 de este documento]). Los polipéptidos sin sus péptidos líder se distinguen a veces en este documento mediante el uso de un 'NL', por ejemplo, NadA^(NL) o NadA^{(C)(NL)}. Los polipéptidos preferidos de NadA tienen una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene una identidad del 50% o más (por ejemplo, del 60%, del 70%, del 80%, del 90%, del 95%, del 99% o más) con la ID. SEC. N°: 2; y/o (b) comprende un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de la ID. SEC. N°: 1, en la que n es 7 o
35 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) en el C-terminal y/o el N-terminal de la ID. SEC. N°: 1 (por ejemplo, NadA^(C), NadA^(NL), NadA^{(C)(NL)}). Otros fragmentos preferidos comprenden un epítipo de la ID. SEC. 1, y un fragmento particularmente preferido de la ID. SEC. 1 es la ID. SEC. 2. Estas diversas secuencias incluyen variantes de la NadA (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Varias secuencias de la NadA se muestran en la Figura 9 de la referencia 34.

La proteína '741' de MenB se desvela en la referencia 25 (ID. SEC. 2535 & 2536) y como 'NMB1870' en la referencia 21 (véase también el número de acceso del GenBank: GI:7227128). La correspondiente proteína del serogrupo A [35] tiene el número de acceso del GenBank 7379322. La 741 es de forma natural una lipoproteína. Cuando se usa según la presente invención, la proteína 741 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de la 741 son
45 variantes por truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 29 a 31. En particular, el N-terminal de la 741 puede estar deleccionado hasta, e incluyendo, su secuencia de poliglicina (es decir, delección de los residuos 1 a 72 para la cepa MC58 [ID. SEC. N°: 3 de este documento]), que a veces se distingue en este documento mediante el uso de un prefijo 'AG'. Esta delección puede mejorar la expresión. La delección también elimina el sitio de lipidación 741's. Las secuencias de 741 tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o más (por ejemplo, del 90%, del 95%, del 99% o más) con la ID. SEC. N°: 3. Las secuencias preferidas de la 741 comprenden un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de la ID. SEC. N°: 3, donde 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 comprenden un epítipo de 741. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más
55 aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) sin el C-terminal y/o el N-terminal de la ID. SEC. N°: 3. Estas secuencias incluyen variantes de la 741 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Varias secuencias de la 741 pueden encontrarse en las ID. SEC. 1 a 22 de la referencia 31, en las ID. SEC. 1 a 23 de la referencia 36, y en las ID. SEC. 1-299 de la referencia 37.

La proteína 741 es un antígeno extremadamente eficaz para desencadenar respuestas de anticuerpos anti-meningocócicos, y se expresa en todos los serogrupos de meningococos. El análisis filogenético muestra que la proteína se divide en dos grupos, y que uno de estos se divide de nuevo para dar tres variantes en total [38], y

aunque el suero creado frente a una variante usada es bactericida en el mismo grupo de variantes, no es activo frente a cepas que expresan una de las otras dos variantes, es decir, hay una protección cruzada intra-variantes, pero no una protección cruzada inter-variantes [36,38]. Para una eficacia máxima en cepas cruzadas, por lo tanto, se prefiere que una composición incluya más de una variante de la proteína 741. Un ejemplo de secuencia de cada variante se da en las ID. SEC. N^{os}: 10, 11 y 12 en este documento, partiendo de un residuo de cisteína N-terminal al que se unirá covalentemente un lípido en la forma natural de la lipoproteína. Por lo tanto se prefiere que la composición incluya al menos dos de: (1) una primera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el $a\%$ con la ID. SEC. N^o: 10 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en un fragmento de al menos x aminoácidos contiguos de la ID. SEC. N^o: 10; (2) una segunda proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el $b\%$ con la ID. SEC. N^o: 11 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en un fragmento de al menos y aminoácidos contiguos de la ID. SEC. N^o: 11; y (3) una tercera proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el $c\%$ con la ID. SEC. N^o: 12 y/o que comprende una secuencia de aminoácidos consistente en un fragmento de al menos z aminoácidos contiguos de la ID. SEC. N^o: 12. El valor de a es de 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 de 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 de 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 de 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 de 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 de 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 dada de aminoácidos de 741 no esté en más de una de las categorías (1), (2) y (3). Cualquier secuencia dada de 741 estará únicamente en una de las categorías (1), (2) y (3). Por lo tanto se prefiere que: la proteína (1) tenga menos de un $p\%$ de identidad de secuencia con la proteína (2); la proteína (1) tenga menos de un $j\%$ de identidad de secuencia con la proteína (3); y la proteína (2) tenga menos de un $k\%$ de identidad de secuencia con la proteína (3). El valor de i es de 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 es como mucho de a . El valor de j es de 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 es como mucho de b . El valor de k es de 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 es como mucho de c . Los valores de i , j y k no están intrínsecamente relacionados entre sí.

La proteína '936' del serogrupo B se desvela en la referencia 25 (ID. SEC. 2883 & 2884) y como 'NMB2091' en la referencia 21 (véase también el número de acceso del GenBank GI:7227353). El correspondiente gen del serogrupo A [35] tiene el número de acceso del GenBank 7379093. Cuando se usa según la presente invención, la proteína 936 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de la 936 son variantes por truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 29 a 31. En particular, puede deleccionarse el péptido líder N-terminal de 936 (por ejemplo, delección de los residuos 1 a 23 para la cepa MC58, para dar 936^(NL) [ID. SEC. N^o: 4 de este documento]). Las secuencias de 936 tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o más (por ejemplo, del 90%, del 95%, del 99% o más) con la ID. SEC. N^o: 4. Las secuencias preferidas de 936 comprenden un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de la ID. SEC. N^o: 4, donde 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 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 C-terminal y/o del N-terminal de la ID. SEC. N^o: 4. Estas secuencias incluyen variantes de la 936 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.).

La proteína '953' del serogrupo B se desvela en la referencia 25 (ID. SEC. 2917 & 2918) y como 'NMB1030' en la referencia 21 (véase también el número de acceso del GenBank GI:7226269). La correspondiente proteína del serogrupo A [35] tiene el número de acceso del GenBank 7380108. Cuando se usa según la presente invención, la proteína 953 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de la 953 son variantes por truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 29 a 31. En particular, el péptido líder N-terminal de la 953 puede estar deleccionado (por ejemplo, delección de los residuos 1 a 19 para la cepa MC58, para dar 953^(NL) [ID. SEC. N^o: 5 de este documento]). Las secuencias de 953 tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o más (por ejemplo, del 90%, del 95%, del 99% o más) con la ID. SEC. N^o: 5. Las secuencias preferidas de 953 comprenden un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de la ID. SEC. N^o: 5, donde n es 7 o más (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 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 C-terminal y/o del N-terminal de la ID. SEC. N^o: 5. Estas secuencias incluyen variantes de la 936 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Las formas alélicas de la 953 pueden observarse en la Figura 19 de la referencia 28.

La proteína '287' del serogrupo B se desvela en la referencia 25 (ID. SEC. 3103 & 3104), como 'NMB2132' en la

referencia 21, y como 'GNA2132' en la referencia 22 (véase también el número de acceso del GenBank GI:7227388). La correspondiente proteína del serogrupo A [35] tiene el número de acceso del GenBank 7379057. Cuando se usa según la presente invención, la proteína 287 puede tomar varias formas. Las formas preferidas de la 287 son variantes por truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 29 a 31. En particular, el N-terminal de la 287 puede estar delecionado hasta, e incluyendo, su secuencia de poliglicina (por ejemplo, delección de los residuos 1 a 24 para la cepa MC58, para dar AG287 [ID. SEC. N°: 6 de este documento]. Esta delección puede mejorar la expresión. Las secuencias de 287 tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 80% o más (por ejemplo, del 90%, del 95%, del 99% o más) con la ID. SEC. N°: 6. Las secuencias preferidas de 287 comprenden un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de la ID. SEC. N°: 6, donde 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 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 C-terminal y/o del N-terminal de la ID. SEC. N°: 6. Estas secuencias incluyen variantes de la 287 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Las formas alélicas de la 287 pueden observarse en las Figuras 5 y 15 de la referencia 28, y en el ejemplo 13 y en la figura 21 de la referencia 25 (ID. SEC. 3179 a 3184).

Los cinco antígenos básicos de la MenB (NadA, 741, 953, 936 & 287) pueden estar presentes en la composición como cinco proteínas individuales, pero se prefiere que al menos dos de los antígenos se expresen como una cadena polipeptídica (una proteína 'híbrida' [refs. 29 a 31]), es decir, de forma que los cinco antígenos formen menos de cinco polipéptidos. Las proteínas híbridas ofrecen dos ventajas: en primer lugar, puede ayudarse a una proteína que puede ser inestable o poco expresada por sí misma añadiendo un compañero híbrido adecuado que solucione el problema; en segundo lugar, la elaboración comercial se simplifica ya que sólo se necesita emplear una expresión y purificación con objeto de producir dos proteínas útiles por separado. 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 básicos. Se prefieren los híbridos consistentes en dos de los cinco antígenos.

Dentro de la combinación de los cinco antígenos básicos, un antígeno puede estar presente en más de una proteína híbrida y/o como una proteína no híbrida. Sin embargo se prefiere que haya un antígeno presente bien como un híbrido o bien como un no híbrido, pero no como ambos, aunque puede ser útil incluir la proteína 741 tanto como un antígeno híbrido como no híbrido (preferiblemente una lipoproteína), particularmente cuando se usa más de una variante de la 741.

Las proteínas híbridas pueden representarse mediante la fórmula **NH₂-A-[-X-L-]_n-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 N-terminal opcional; B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional; y n es 2, 3, 4 ó 5.

Si una fracción -X- tiene una secuencia peptídica líder en su forma natural, esta puede incluirse u omitirse en la proteína híbrida. En algunas formas de realización, los péptidos líder serán delecionados excepto aquel de la fracción -X- ubicado en el N- terminal de la proteína híbrida, es decir, se conservará el péptido líder de X₁, pero los péptidos líder de X₂ ... X_n se omitirán. Esto es equivalente a delecionar todos los péptidos líder y usar el péptido líder de X₁ como fracción -A-.

Por cada n casos de [-X-L-], la secuencia de aminoácidos conectora -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando $n = 2$, el híbrido puede ser NH₂-X₁-L₁-X₂-L₂-COOH, NH₂-X₁-X₂-COOH, NH₂-X₁-L₁-X₂-COOH, NH₂-X₁-X₂-L₂-COOH, etc. La(s) secuencia(s) de aminoácidos conectora(s) -L- serán típicamente cortas (por ejemplo, de 20 o menos aminoácidos, es decir, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Algunos ejemplos comprenden secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación, conectores de poliglicina (es decir, que comprenden Gln donde $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más), y colas de histidina (es decir, His _{n} donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos conectoras serán apreciables por los expertos en la materia. Un conector útil es GSGGGG (ID. SEC. 9), estando formado el dipéptido Gly-Ser a partir de un sitio de restricción BamHI, ayudando así a la clonación y la manipulación, y siendo el tetrapéptido (Gly)₄ un conector típico de poliglicina. Si X _{$n+1$} es una proteína Δ G y L _{n} es un conector de glicina, esta puede ser equivalente a que X _{$n+1$} no sea una proteína Δ G y L _{n} esté ausente.

-A- es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional. Esta será típicamente corta (por ejemplo, de 40 aminoácidos o menos, 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). Algunos ejemplos incluyen secuencias líder para dirigir el tráfico de proteínas, o secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o la purificación (por ejemplo, colas de histidina, es decir, His _{n} donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácidos N-terminal adecuada serán apreciables por los expertos en la materia. Si X₁ carece de su propia metionina N-terminal, -A- es preferiblemente un oligopéptido (por ejemplo, con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos) que proporciona una metionina N-terminal.

-B- es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional. Esta será típicamente corta (por ejemplo, de 40 aminoácidos o menos, 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). Algunos ejemplos incluyen secuencias para dirigir el tráfico de

proteínas, secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o la purificación (por ejemplo que comprenden colas de histidina, es decir, His_n donde n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), o secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína. Otras secuencias de aminoácidos C-terminal adecuadas serán apreciables por los expertos en la materia.

- 5 Muy preferiblemente, n es 2. Los híbridos de los antígenos para su uso en la invención comprenden: NadA & 741; NadA & 936; NadA & 953; NadA & 287; 741 & 936; 741 & 953; 741 & 287; 936 & 953; 936 & 287; 953 & 287. Dos proteínas preferidas son: X₁ es una 936 y X₂ es una 741; X₁ es una 287 y X₂ es una 953.

Dos proteínas híbridas particularmente preferidas de la invención son como sigue:

n	A	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	B	ID. SEC. Nº:
2	MA	ΔG287	GSGGGG	953 ^(NL)	-	-	7
2	M	936 ^(NL)	GSGGGG	AG741	-	-	8

- 10 Estas dos proteínas pueden usarse en combinación con NadA (particularmente con la ID. SEC. Nº: 2). Así, una composición preferida de antígenos de MenB para su uso para invención incluye por tanto un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. Nº: 2, un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. Nº: 7 y un tercer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. Nº: 8. Este es un grupo preferido de antígenos de MenB para su uso con la invención.

- 15 Según se mencionó anteriormente, las composiciones de la invención que incluyen antígenos de MenB pueden inducir preferiblemente una respuesta sérica de anticuerpos bactericidas que es eficaz frente a dos o tres de los linajes hipervirulentos de MenB A4, ET-5 y el linaje 3. Adicionalmente pueden inducir respuestas de anticuerpos bactericidas frente a uno o más linajes hipervirulentos del subgrupo a I, del subgrupo III, del subgrupo IV-1 o del complejo ET-37, y frente a otros linajes, por ejemplo, linajes hiperinvasivos. Estas respuestas de anticuerpos se miden convenientemente en ratones y son un indicador estándar de la eficacia de la vacuna [véase, por ejemplo, la
20 nota final 14 de la referencia 22]. La actividad bactericida sérica (*serum bactericidal activity*, SBA) mide la destrucción bacteriana mediada por el complemento, y puede ensayarse usando complemento humano o de cría de ratón. Los estándares de la WHO requieren una vacuna que induzca al menos un aumento de cuatro veces en la SBA en más del 90% de los receptores.

- 25 La composición no debe inducir anticuerpos bactericidas frente a todas y cada una de las cepas de MenB dentro de estos linajes hipervirulentos; más bien, para cualquier grupo dotado de cuatro o más cepas de meningococos del serogrupo B dentro de un linaje hipervirulento en particular, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas frente al menos el 50% (por ejemplo, el 60%, el 70%, el 80%, el 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,
30 NZ, NL, BR y CU. El suero tiene preferiblemente un título bactericida de al menos 1024 (por ejemplo, 2¹⁰, 2¹¹, 2¹², 2¹³, 2¹⁴, 2¹⁵, 2¹⁶, 2¹⁷, 2¹⁸ o mayor, preferiblemente de al menos 2¹⁴), es decir, el suero es capaz de destruir al menos el 50% de las bacterias de la prueba de una cepa en particular cuando se diluye a 1/1024, según se describe en la referencia 22. Las composiciones preferidas pueden inducir respuestas bactericidas frente a las siguientes cepas de meningococos del serogrupo B: (i) del agregado A4, las cepas 961-5945 (B:2b:P1.21,16) y/o la cepa G2136 (B:-); (ii) del complejo ET-5, la cepa MC58 (B:15:P1.7,16b) 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:-). Las composiciones más preferidas pueden inducir respuestas bactericidas frente a las cepas 961-5945, 44/76 y 394/98. Las cepas 961-5945 y G2136 son ambas cepas de referencia de *Neisseria* MLST [ids 638 & 1002 en la ref. 39]. La cepa MC58 está ampliamente disponible (por ejemplo, ATCC BAA-335) y era la cepa secuenciada en la referencia 21. La cepa 44/76 se ha usado y caracterizado ampliamente (por
40 ejemplo, ref. 40) y es una de las cepas de referencia de *Neisseria* MLST [id 237 en la ref. 39; fila 32 de la Tabla 2 en la ref. 41]. La cepa 394/98 se aisló originalmente en Nueva Zelanda en 1998, y se han publicado diversos estudios usando esta cepa (por ejemplo, en las refs. 42 & 43). La cepa BZ198 es otra cepa de referencia de MLST [id 409 en la ref. 39; fila 41 de la Tabla 2 en la ref. 41]. La composición puede inducir adicionalmente una respuesta bactericida frente a la cepa LNP17592 del serogrupo W135 (W135:2a:P1.5,2), del complejo ET-37. Esta es una cepa Haji
45 aislada en Francia en 2000.

- Otros antígenos polipeptídicos de MenB que pueden incluirse en las composiciones de la invención incluyen aquellos que comprenden una de las siguientes secuencias de aminoácidos: ID. SEC. Nº: 650 de la ref. 23; ID. SEC. Nº: 878 de la ref. 23; ID. SEC. Nº: 884 de la ref. 23; ID. SEC. Nº: 4 de la ref. 24; ID. SEC. Nº: 598 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 818 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 864 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 866 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 1196 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 1272 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 1274 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 1640 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 1788 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2288 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2466 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2554 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2576 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2606 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2608 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2616 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2668 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2780 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2932 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2958 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2970 de la ref. 25; ID. SEC. Nº: 2988 de la ref. 25, o un polipéptido que
50

comprende una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene una identidad del 50% o más (por ejemplo, del 60%, del 70%, del 80%, del 90%, del 95%, del 99% o más) con dichas secuencias; y/o (b) comprende un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de dichas secuencias, donde 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) comprenden un epítipo de la secuencia relevante. Puede incluirse más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6) de estos polipéptidos.

Haemophilus influenzae de tipo B (Hib)

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

10 Ventajosamente, el sacárido de Hib está conjugado covalentemente con una proteína portadora con objeto de mejorar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de los conjugados de polisacáridos en general, y del polisacárido capsular de Hib en particular, está bien documentada [por ejemplo, referencias 44 a 52 etc.]. La invención puede usar cualquier conjugado de Hib adecuado. Algunas proteínas portadoras adecuadas se describen a continuación, y los portadores preferidos para los sacáridos de Hib son CRM₁₉₇ ('HbOC'), el toxoide tetánico ('PRP-T') y el complejo de la membrana externa de *N. meningitidis* ('PRP-OMP').

15 La fracción de sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo, fosfato de polirribosilribitol completo (PRP)), pero se prefiere hidrolizar los polisacáridos para formar oligosacáridos (por ejemplo, con un PM desde ~1 hasta ~5 kDa).

Un conjugado preferido comprende un oligosacárido de Hib unido covalentemente a CRM₁₉₇ a través de un conector de ácido adípico [53, 54]. El toxoide tetánico también es un portador preferido.

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

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

25 Cuando una composición incluye un antígeno sacárido de Hib, se prefiere que no incluya también un coadyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un coadyuvante de fosfato de aluminio, entonces el antígeno de Hib puede adsorberse al coadyuvante [55] o puede no adsorberse [12]. La prevención de la absorción puede conseguirse seleccionando el pH correcto durante la mezcla del antígeno/coadyuvante, un coadyuvante con un punto apropiado de carga cero, y un orden apropiado de mezcla de los diversos antígenos diferentes en una composición [56].

Los antígenos de Hib pueden estar liofilizados, por ejemplo, junto con antígenos de meningococos.

30 Streptococcus pneumoniae

Cuando la composición incluye un antígeno de *S. pneumoniae*, será típicamente un antígeno de sacárido capsular que está preferiblemente conjugado con una proteína portadora [por ejemplo, refs. 57 a 59]. Se prefiere que incluya sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, se usan ampliamente mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes, ya que son vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [60].
35 Por ejemplo, Prevnar™ [61] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) con cada sacárido conjugado individualmente con CRM₁₉₇ mediante una aminación reductora, con 2 μg de cada sacárido por dosis de 0,5 ml (4 μg del serotipo 6B), y con conjugados adsorbidos sobre un coadyuvante de fosfato de aluminio. Las composiciones de la invención incluyen preferiblemente al menos los serotipos 6B, 14, 19F y 23F. Los conjugados pueden estar adsorbidos sobre un fosfato de aluminio.

40 Como alternativa al uso de antígenos de sacáridos de meningococos, la composición puede incluir uno o más antígenos polipeptídicos. Están disponibles las secuencias genómicas de diversas cepas de neumococos [62,63] y pueden someterse a una vacunología inversa [64-67] para identificar los antígenos polipeptídicos adecuados [68,69]. 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, según se define en la referencia 70. La composición puede
45 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 formas de realización, la composición puede incluir tanto antígenos sacáridos como polipeptídicos de neumococos. Éstos pueden usarse en una mezcla simple, o puede conjugarse el antígeno sacárido de neumococo con una proteína de neumococo. Las proteínas portadoras adecuadas para dichas formas de realización incluyen los antígenos enumerados en el párrafo previo [70].

50 Los antígenos de neumococos pueden liofilizarse, por ejemplo, junto con antígenos de meningococos y/o de Hib.

Sacáridos del serogrupo A modificado de N. meningitidis

La composición de la invención incluye un antígeno sacárido de MenA. El antígeno es preferiblemente un sacárido modificado en el que uno o más de los grupos hidroxilo del sacárido natural han sido reemplazados por un grupo

bloqueante [19]. Esta modificación aumenta la resistencia a la hidrólisis, y significa que el antígeno del serogrupo A puede almacenarse y usarse en una formulación líquida en lugar de requerir una liofilización.

El número de unidades de monosacáridos con grupos bloqueantes puede variar. Por ejemplo, todas o sustancialmente todas las unidades de monosacáridos pueden tener grupos bloqueantes. Alternativamente, al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de las unidades de monosacáridos pueden tener grupos bloqueantes. 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 bloqueantes.

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

La unidad de monosacárido terminal puede tener o no un grupo bloqueante en lugar de su hidroxilo. Se prefiere que conserve un grupo hidroxilo anomérico libre en una unidad de monosacárido terminal con objeto de proporcionar un brazo para regiones adicionales (por ejemplo, de conjugación). Los grupos hidroxilo anoméricos pueden convertirse en grupos amino (-NH₂ o -NH-E, donde E es un grupo protector de nitrógeno) mediante una aminación reductora (usando, por ejemplo, NaBH₃CN/NH₄Cl), y pueden ser regenerados posteriormente después de que otros grupos hidroxilo se hayan convertido en grupos bloqueantes.

Los grupos bloqueantes que sustituyen los grupos hidroxilo pueden ser accesibles directamente a través de una reacción de derivatización del grupo hidroxilo, es decir, reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo por otro grupo. Algunos derivados adecuados de grupos hidroxilo que actúan como grupos bloqueantes son, por ejemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (por ejemplo, éteres de sililo o éteres de alquilo) y acetales. Algunos ejemplos específicos de dichos grupos bloqueantes son alilo, Aloe, bencillo, BOM, t-butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, etc. Otros grupos bloqueantes que no son directamente accesibles y que reemplazan completamente el grupo hidroxilo incluyen alquilo C₁₋₁₂, alquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, NR¹R² (R¹ y R² se definen en el siguiente párrafo), H, F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃, CCl₃, etc. Los grupos bloqueantes preferidos son grupos capturadores de electrones. Los grupos bloqueantes preferidos tienen la fórmula: -O-X-Y u -OR₃ en la que: X es C(O), S(O) o SO₂; Y es alquilo C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ o arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 ó 3 grupos elegidos independientemente de entre F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o I es NR¹R²; R¹ y R² se eligen independientemente de entre H, alquilo C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆; o R¹ y R² pueden unirse para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂; R³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 ó 3 grupos elegidos independientemente de entre F, Cl, Br, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o R³ es arilo C₅₋₁₂ o arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 ó 5 grupos elegidos de entre F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃. Cuando R³ es un alquilo C₁₋₁₂ o un cicloalquilo C₃₋₁₂, típicamente está sustituido con 1, 2 ó 3 grupos según se definió anteriormente. Cuando R¹ y R² están unidos para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂, se entiende que R¹ y R², junto con el átomo de nitrógeno, forman un grupo heterocíclico saturado que contiene cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). El grupo heterocíclico puede contener 1 ó 2 heteroátomos (tales como N, O ó S) distintos al átomo de nitrógeno. Algunos ejemplos de grupos heterocíclico saturados C₃₋₁₂ son pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperacinilo, imidazolidinilo, acetidinilo y aciridinilo.

Los grupos bloqueantes -O-X-Y y -OR³ pueden prepararse a partir de grupos -OH mediante procedimientos de derivatización estándar, tales como la reacción del grupo hidroxilo con un haluro de acilo, un haluro de alquilo, un haluro de sulfonilo, etc. Por lo tanto, el átomo de oxígeno de -O-X-Y es preferiblemente el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo -X-Y de -O-X-Y reemplaza preferiblemente al átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo.

Alternativamente, los grupos bloqueantes pueden ser accesibles a través de una reacción de sustitución, tal como una sustitución de tipo Mitsunobu. Estos y otros procedimientos para preparar grupos bloqueantes a partir de grupos hidroxilo son bien conocidos.

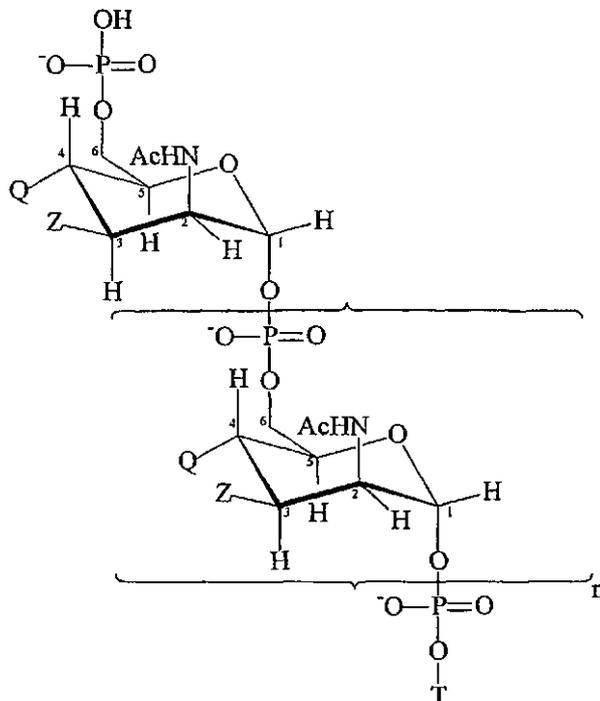
Más preferiblemente, el grupo bloqueante es -OC(O)CF₃ [71], o un grupo carbamato -OC(O)NR¹R², donde R¹ y R² se eligen independientemente de entre alquilo C₁₋₆. Más preferiblemente, R¹ y R² son ambos metilo, es decir, el grupo bloqueante es -OC(O)NMe₂. Los grupos bloqueantes de carbamato tienen un efecto estabilizante sobre el enlace glucosídico, y pueden prepararse en condiciones suaves.

Los sacáridos modificados preferidos de MenA contienen n unidades de monosacáridos, donde 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 de 24 o más (por ejemplo, de 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 ó 100) y preferiblemente es de 50 o más. Los grupos -OH ausentes son preferiblemente grupos bloqueantes, según se definió anteriormente.

Otro sacáridos modificados preferidos de MenA comprenden unidades de monosacáridos en las que al menos s de las unidades de monosacáridos no tienen el -OH en la posición 3 y no tienen el -OH en la posición 4. El valor de s es

de al menos 1 (por ejemplo, de 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 preferiblemente grupos bloqueantes, según se definió anteriormente.

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

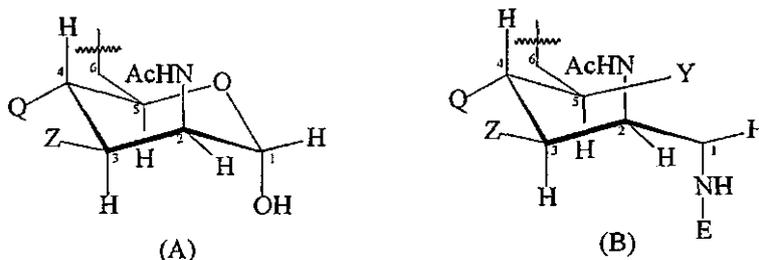


5

en la que

n es un número entero entre 1 y 100 (preferiblemente un número entero entre 15 y 25);

T tiene la formula (A) o (B):



10 cada grupo Z se elige independientemente de entre OH o un grupo bloqueante según se definió anteriormente; y cada grupo Q se elige independientemente de entre OH o un grupo bloqueante según se definió anteriormente; Y se elige de entre OH o un grupo bloqueante según se definió anteriormente; E es H o un grupo protector de nitrógeno; y donde más de aproximadamente el 7% (por ejemplo, el 8%, el 9%, el 10% o más) de los grupos Q son grupos bloqueantes.

15 Cada uno de los grupos $n+2$ Z pueden ser iguales o diferentes entre sí. Asimismo, cada uno de los grupos $n+2$ Q pueden ser iguales o diferentes entre sí. Todos los grupos Z pueden ser OH. Alternativamente, al menos el 10%, el 20, el 30%, el 40%, el 50% o el 60% de los grupos Z pueden ser OAc. Preferiblemente, aproximadamente el 70% de los grupos Z son OAc, siendo el resto de los grupos Z OH o grupos bloqueantes según se definió anteriormente. Al menos aproximadamente el 7% de los grupos Q son grupos bloqueantes. Preferiblemente, al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o incluso el 100% de los grupos Q son grupos bloqueantes.

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 inicial total del sacárido conjugado de MenA no estará conjugado, donde f es 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o inferior.

Oligosacáridos

Los sacáridos capsulares se usarán generalmente en forma de oligosacáridos. Estos se forman convenientemente mediante la fragmentación de un polisacárido capsular purificado (por ejemplo, mediante hidrólisis), que habitualmente estará seguida por la purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

5 La fragmentación de los polisacáridos se realiza preferiblemente para dar un grado de polimerización medio final (*degree of polymerisation*, DP) en el oligosacárido de menos de 30 (por ejemplo, de entre 10 y 20, preferiblemente de alrededor de 10 para el serogrupo A; de entre 15 y 25 para los serogrupos W135 e Y, preferiblemente de alrededor de 15-20; de entre 12 y 22 para el serogrupo C; etc.). El DP puede medirse convenientemente mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante ensayos colorimétricos [72].

Los antígenos de sacáridos de MenC preferidos se desvelan en la referencia 10, según se usan en Menjugate™.

10 Si se realiza una hidrólisis, el hidrolizado se dimensionará generalmente con objeto de eliminar los oligosacáridos cortos [73]. Esto puede conseguirse de varias formas, tal como una ultrafiltración seguida de una cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización de menos de, o igual a, aproximadamente 6, preferiblemente se eliminan para el serogrupo A, y aquellos de menos de alrededor de 4 preferiblemente se eliminan para los serogrupos W135 e Y.

15 *Conjugación covalente*

Los sacáridos capsulares de las composiciones de la invención estarán conjugados habitualmente con proteína(s) portadora(s). En general, la conjugación mejora la inmunogenicidad de los sacáridos ya que los convierte desde antígenos independientes de T en antígenos dependientes de T, permitiendo así el cebado de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil en vacunas [por ejemplo, ref. 74] y es una técnica bien conocida, por ejemplo, revisada en las refs. 44 a 52, etc.].

25 Las proteínas portadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como el toxoide diftérico o el toxoide tetánico. Se prefiere particularmente en toxoide diftérico CRM₁₉₇ [75-77]. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de la membrana exterior de *N. meningitidis* [78], péptidos sintéticos [79,80], proteínas de choque térmico [81,82], proteínas tosferínicas [83, 84], citocinas [85], linfoquinas [85], hormonas [85], factores de crecimiento [85], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4⁺ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos [86], la proteína D de *H. influenzae* [87,88], la proteína superficial meningocócica PspA [89], proteínas de captación de hierro [90], la toxina A o B de *C. difficile* [91], etc. Los portadores preferidos son el toxoide diftérico, el toxoide tetánico, la proteína D de *H. influenzae* y CRM₁₉₇.

30 En una composición de la invención es posible usar más de una proteína portadora, por ejemplo, para reducir el riesgo de la supresión del portador. Por lo tanto, pueden usarse diferentes proteínas portadoras para diferentes serogrupos, por ejemplo, los sacáridos del serogrupo A podrían conjugarse con CRM₁₉₇, mientras que los sacáridos del serogrupo C podrían conjugarse con el toxoide tetánico. También es posible usar más de una proteína portadora para un antígeno sacárido en particular, por ejemplo, los sacáridos del serogrupo A podrían estar en dos grupos, algunos conjugados con CRM₁₉₇ y otros conjugados con el toxoide tetánico. El general, sin embargo, se prefiere usar la misma proteína portadora para todos los sacáridos.

35 Una única proteína portadora podría aportar más de un antígeno sacárido [92]. Por ejemplo, una única proteína portadora podría tener conjugados sacáridos de los serogrupos A y C. Para conseguir este objetivo, los sacáridos pueden mezclarse antes de la reacción de conjugación. Sin embargo, en general, se prefiere tener conjugados por separado para cada serogrupo.

40 Se prefieren los conjugados con una proporción sacárido:proteína (p/p) de hasta 1:5. Se prefieren las proporciones de hasta 1:2, mientras que las proporciones entre 1:1,25 y 1:2,5 son más preferidas

45 Los conjugados pueden usarse junto con una proteína portadora libre [93]. Cuando hay presente una proteína portadora dada tanto en forma libre como en forma conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es preferiblemente de no más del 5% de la cantidad total de la proteína portadora en la composición como un todo, y más preferiblemente está presente en menos del 2% en peso.

Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier conector adecuado donde sea necesario.

50 El sacárido será típicamente activado o funcionalizado antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos cianilantes tales como CDAP (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio [94, 95, etc.]). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidracidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción de la referencia 50).

55 Las uniones a través de un grupo conector pueden realizarse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 96 y 97. Un tipo de unión implica una aminación reductora del polisacárido, acoplar el grupo amino resultante con un extremo de un grupo conector de ácido adípico, y después acoplar una proteína en el otro extremo del grupo conector de ácido adípico [48, 98, 99]. Otros conectores incluyen B-propionamida [100], nitrofeniletilamina [101], haluros de haloacilo [102], uniones glucosídicas [103], ácido 6-

aminocaproico [104], ADH [105], fracciones C₄ a C₁₂ [106] etc. Como alternativa al uso de un conector, puede usarse una unión directa. Las uniones directas a la proteína pueden comprender la oxidación del polisacárido seguido por una aminación reductora con la proteína, según se describe, por ejemplo, en las referencias 107 y 108.

5 Se prefiere un proceso que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, reemplazando los grupos terminales =O por -NH₂) seguido de una derivatización con diéster adípico (por ejemplo, N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico) y la reacción con la proteína portadora. Otra reacción preferida usa una activación de CDAP con una proteína portadora D, por ejemplo, para MenA o MenC.

10 Tras la conjugación pueden separarse los sacáridos libres de los conjugados. También hay muchos procedimientos adecuados, incluyendo cromatografía de interacciones hidrófobas, ultrafiltración tangencial, diafiltración etc. [véanse también las refs. 109 & 110, etc.].

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

Preparación de las composiciones de la invención

15 Las composiciones de la invención comprenden sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*. Los sacáridos se preparan preferiblemente por separado (incluyendo cualquier fragmentación, conjugación, etc.) y después se mezclan para dar una composición de la invención.

20 Se prefiere que el sacárido del serogrupo A no se combine con otro(s) sacárido(s) poco antes de su uso, con objeto de minimizar el potencial de hidrólisis. Esto puede conseguirse convenientemente teniendo el componente del serogrupo A (típicamente junto con los excipientes apropiados) en forma liofilizada y el (los) otro componente(s) de serogrupo(s) en forma líquida (también con los excipientes apropiados), usándose los componentes líquidos para reconstituir el componente liofilizado de MenA cuando esté listo para su uso. Cuando se usa un coadyuvante de sal de aluminio, se prefiere incluir el coadyuvante en el vial que lo contiene con la vacuna líquida, y liofilizar el componente de MenA sin coadyuvante.

25 Una composición de la invención puede prepararse por tanto a partir de un kit que comprende: (a) sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*, en forma liofilizada; y (b) sacáridos capsulares de los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis* en forma líquida. Le invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición de la invención, que comprende mezclar un sacárido capsular liofilizado del serogrupo A de *N. meningitidis* con sacáridos capsulares de los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*, donde dichos sacáridos están en forma líquida.

30 La invención también proporciona una composición de la invención que comprende sacáridos capsulares de los serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*, donde los sacáridos están en forma líquida. Esta composición se envasa con un antígeno sacárido liofilizado del serogrupo A, para su reconstitución.

Presentación de las composiciones de la invención

Las composiciones de la invención pueden presentarse y envasarse de varias formas.

35 Las composiciones pueden presentarse en viales, o pueden presentarse en jeringas precargadas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una única dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una única dosis o múltiples dosis. Las composiciones inyectables serán habitualmente disoluciones o suspensiones líquidas. Alternativamente, pueden presentarse en forma sólida (por ejemplo, liofilizada) para su disolución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

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

45 Cuando una composición de la invención va a prepararse extemporáneamente antes de su uso (por ejemplo, cuando el sacárido del serogrupo A se presenta en forma liofilizada) y se presenta como un kit, el kit puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa precargada y un vial, usándose el contenido de la jeringa para reactivar los componentes del vial antes de la inyección.

50 En cada dosis, la cantidad de un antígeno sacárido individual será generalmente de más de 1 µg (medida como masa de sacárido), siendo preferido aproximadamente 2,5 µg, 5 µg o 10 µg de cada uno. Con unas proporciones ponderales de A:C:W135:Y de 1: 1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2:1, la cantidad es preferiblemente de aproximadamente 2,5 µg, 5 µg o 10 µg.

Las composiciones preferidas tienen aproximadamente los siguientes µg de sacárido por dosis:

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

Las composiciones de la invención comprenden entre 10 µg y las composiciones de la invención comprenden 25 µg de sacáridos de meningococos por dosis. Las composiciones preferidas comprenden entre 10 µg y 20 µg de sacáridos de meningococos por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden 10 µg de sacáridos de meningococos por dosis. Las composiciones de la invención comprenden al menos 10 µg de sacáridos de meningococos por dosis.

Las composiciones de la invención son preferiblemente estériles. Preferiblemente están exentas de pirógenos. Preferiblemente están tamponadas, por ejemplo, a un pH de entre 6 y 8, generalmente alrededor de pH 7. Cuando una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón de histidina [111]. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Coadyuvantes

Las composiciones incluirán generalmente uno o más coadyuvantes. El (los) coadyuvante(s) puede(n) añadirse a los sacáridos antes y/o después de que sean mezclados para formar una composición de la invención, pero se prefiere combinar el coadyuvante con un antígeno sacárido antes de mezclar los diferentes sacáridos.

Sin embargo, no es necesario que cada sacárido sea coadyuvado antes de dicha mezcla. Puede incluirse un exceso de coadyuvante en una preparación de sacárido de forma que, cuando se añada(n) antígeno(s) sacárido(s) no coadyuvado(s) adicional(es), el exceso se diluye hasta una concentración final deseada. En una forma de realización particular, cuando la composición de la invención se prepara a partir de un antígeno liofilizado (por ejemplo, un componente liofilizado del serogrupo A) puede preferirse no incluir un coadyuvante en el material liofilizado.

Los coadyuvantes preferidos para su inclusión en las composiciones de la invención son sales de aluminio (alum), tales como hidróxidos de aluminio (incluyendo oxihidróxidos), fosfatos de aluminio (incluyendo hidroxifosfatos), sulfato de aluminio, etc. [capítulos 8 & 9 en la ref. 112]. Particularmente se prefiere el hidroxifosfato de aluminio, particularmente en composiciones que incluyen un antígeno sacárido de *H. influenzae*, y un coadyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar PO₄/Al de entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg Al³⁺/ml. Puede usarse la adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio, por ejemplo, de entre 50 y 100 µg de Al³⁺ por conjugado y por dosis. Cuando hay más de un conjugado en la composición, no todos los conjugados necesitan estar adsorbidos. Los conjugados de MenC Menjugate™ y NeisVac™ usan un coadyuvante de hidróxido, mientras que Meningitec™ usa un fosfato.

El fosfato cálcico es otro coadyuvante preferido.

Otros coadyuvantes que pueden usarse además, o en lugar, de las sales de aluminio incluyen:

A. Composiciones que contienen minerales

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como coadyuvantes 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 & 9 de la ref. 112], o mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y siendo preferida la adsorción. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de una sal metálica [113].

B. Emulsiones oleosas

Las composiciones en emulsiones oleosas adecuadas para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 [capítulo 10 de la ref. 112; véase también ref. 114] (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85, formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidificador). También pueden usarse el coadyuvante completo de Freund (CFA) y el coadyuvante incompleto de Freund (IFA).

C. Formulaciones de Saponina [capítulo 22 de la ref. 112]

Las formulaciones de saponina también pueden usarse como coadyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos esteroides y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallo, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina ha sido ampliamente estudiada como coadyuvante. La saponina también puede obtenerse

comercialmente a partir de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officianalis* (hierba jabonera). Las formulaciones con coadyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOMs. La QS21 se comercializa como Stimulon™.

5 Las composiciones con saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Usando estas técnicas se han identificado fracciones purificadas específicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es la QS21. Un procedimiento de producción de la QS21 se desvela en la ref. 115. Las formulaciones con saponina también puede comprender un esteroles, tal como colesterol [116].

10 Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) [capítulo 23 de la ref. 112]. Los ISCOMs incluyen también típicamente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. En los ISCOMs puede usarse cualquier saponina conocida. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOMs se describen adicionalmente en las refs. 116-118. Opcionalmente, los ISCOMs pueden estar desprovistos de detergente adicional [119].

En las refs. 120 & 121 puede encontrarse una revisión del desarrollo de los coadyuvantes basados saponinas.

15 D. Virosomas y partículas pseudovíricas

También pueden usarse virosomas y partículas pseudovíricas (*virus-like particles*, VLPs) como coadyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus combinadas o formuladas opcionalmente con un fosfolípido. Generalmente no son patógenos ni replicativos, y generalmente no contienen ningún genoma del virus natural. Las proteínas víricas pueden producirse recombinantemente o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para su uso en virosomas o en VLPs incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tales como HA o NA), del virus de la Hepatitis B (tales como las proteínas del núcleo o de la cápsida), del virus de la Hepatitis E, del virus del sarampión, del virus Sindbis, de rotavirus, del virus Coxsackie (o virus de la enfermedad de manos, pies y boca), de retrovirus, del virus de Norwalk, del virus del papiloma humano, del VIH, de bacteriófagos de ARN, del bacteriófago Q β (tales como las proteínas de la cubierta), del bacteriófago GA, del bacteriófago fr, del bacteriófago AP205 y Ty (tales como el retrotransposón Ty y la proteína p1). Las VLPs se discuten adicionalmente en las refs. 122-127. Los virosomas se discuten adicionalmente, por ejemplo, en la ref. 128

E. Derivados bacterianos o microbianos

30 Los coadyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacáridos (LPS) de enterobacterias, derivados del Lípido A, oligonucleótidos inmunoestimulantes y toxinas de ribosilación del ADP y derivados destoxificados de los mismos.

35 Algunos derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil Lípido A (A, MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma preferida de "partícula pequeña" del monofosforil lípido A 3 des-O-acilado se desvela en la ref. 129. Dichas "partículas pequeñas" del 3dMPL son lo suficientemente pequeñas como para ser filtradas estériles a través de una membrana de 0,22 μm [129]. Otros derivados no tóxicos de LPS incluyen miméticos del monofosforil lípido A, tales como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida, por ejemplo, RC-529 [130,131].

Algunos derivados del Lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. El OM-174 se describe, por ejemplo, en las refs. 132 & 133.

40 Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no metilada unida por un enlace fosfato a una guanósina). Los ARN bicatenarios y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) también han demostrado ser inmunoestimulantes.

45 Los CpG's pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones con fosforotioato, y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 134, 135 y 136 desvelan posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, el reemplazamiento de guanósina por 2'-desoxi-7-desazaguanósina. El efecto coadyuvante de los oligonucleótidos con CpG se discute adicionalmente en las refs. 137-142.

50 La secuencia de CpG puede estar dirigida a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [143]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como un ODN con CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de los linfocitos B, tal como un ODN con CpG-B. Los ODNs con CpG-A y CpG-B se discuten en las refs. 144-146. Preferiblemente, el CpG es un tal como un ODN con CpG-A.

Preferiblemente, el oligonucleótido con CpG se construye de forma que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente pueden unirse dos secuencias oligonucleotídicas con CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las refs. 143 & 147-149.

Las toxinas bacterianas de ribosilación del ADP y los derivados destoxificados de los mismos pueden usarse como coadyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT"), del cólera ("CT") o de tosferina ("PT"). El uso de toxinas de ribosilación del ADP destoxificadas como coadyuvantes mucosos se describe en la ref. 150 y como coadyuvantes parenterales en la ref. 151. La toxina o el toxoide está preferiblemente en forma de una holotoxina, que comprende ambas subunidades A y B. Preferiblemente, la subunidad A contiene una mutación destoxificante; preferiblemente, la subunidad B no está mutada. Preferiblemente, el coadyuvante es una LT mutante destoxificada tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas de ribosilación del ADP y de derivados destoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como coadyuvantes puede encontrarse en las refs. 152-159. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferiblemente en las alineaciones de las unidades A y B de las toxinas de ribosilación del ADP establecidas en la ref. 160, incorporadas específicamente al presente documento como referencia en su totalidad.

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [161], etc.) [162], interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulante de las colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

Los bioadhesivos y los mucoadhesivos también pueden usarse como coadyuvantes en la invención. Algunos bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [163] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de ácido poliacrílico, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetil celulosa. El quitosán y los derivados del mismo también pueden usarse como coadyuvantes en la invención [164].

H. Micropartículas

Las micropartículas también pueden usarse como coadyuvantes en la invención. Se prefieren las micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm hasta ~150 μ m de diámetro, más preferiblemente de ~200 nm hasta ~30 μ m de diámetro y muy preferiblemente de ~500 nm hasta ~10 μ m de diámetro) formada a partir de materiales que son biodegradables y no son tóxicos (por ejemplo, un poli(a-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, a poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicólido), opcionalmente tratadas para que tengan una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo con un detergente catiónico, tal como CTAB).

I. Liposomas (capítulos 13 & 14 de la ref. 112)

Algunos ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como coadyuvantes se describen en las refs. 165-167.

J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

Los coadyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [168]. Dichas formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilén sorbitano en combinación con un octoxinol [169], así como alquiléteres de polioxietileno o ésteres tensioactivos en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como octoxonol [170]. Los éteres de polioxietileno preferidos se eligen del siguiente grupo: polioxietilén-9-lauril éter (laureth 9), polioxietilén-9-esteoril éter, polioxietilén-8-esteoril éter, polioxietilén-4-lauril éter, polioxietilén-35-lauril éter y polioxietilén-23-lauril éter.

K. Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones con PCPP se describen, por ejemplo, en las refs. 171 y 172.

L. Péptidos de muramilo

Algunos ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (tr-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

Algunos ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen Imiquamod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las refs. 173 y 174.

La invención también puede comprender combinaciones de uno o más de los coadyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, en la invención pueden usarse las siguientes composiciones coadyuvantes: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [175]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado LPS no tóxico

(por ejemplo, 3dMPL) [176]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [177]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [178]; (6) SAF, que contiene un 10% de escualano, un 0,4% de Tween 80™, un 5% de polímero en bloque de pluronic L121 y thr-MDP, bien microfluidificado en una emulsión submicrométrica o bien sometido a una agitación vorticial para generar una emulsión con un tamaño de partícula mayor. El sistema coadyuvante (7) Ribí™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene un 2% de escualano, un 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo formado por monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (*cell wall skeleton*, CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 112.

Cuando se usa un fosfato de aluminio, es posible adsorber uno o más sacáridos a las sales de aluminio, pero se prefiere no hacerlo, y esto se favorece incluyendo iones fosfato libres en disolución (por ejemplo, mediante el uso de un tampón de fosfato). Cuando se usa un hidróxido de aluminio, se prefiere adsorber los sacáridos a la sal. El uso de hidróxido de aluminio como coadyuvante puede preferirse para el sacárido del serogrupo A.

En las composiciones de la invención es posible adsorber algunos antígenos a un hidróxido de aluminio, pero tener otros antígenos en asociación con un fosfato de aluminio. Para combinaciones tetravalentes de serogrupos de *N. meningitidis* de la invención, hay disponibles, por ejemplo, las siguientes permutaciones:

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

Componentes adicionales de las composiciones

Además de los antígenos descritos anteriormente, las composiciones de la invención pueden incluir antígenos proteicos de meningococos.

También pueden incluirse antígenos que no son de meningococos ni de *Neisseria*, preferiblemente aquellos que no disminuyen la respuesta inmunitaria frente a los componentes de meningococos. La ref. 179, por ejemplo, desvela combinaciones de oligosacáridos de los serogrupos B y C de *N. meningitidis* junto con el sacárido Hib. Se prefieren los antígenos de neumococos, del virus de la hepatitis A, del virus de la hepatitis B, de *B. pertussis*, de difteria, de tétanos, de polio y/o de *H. influenzae*. Los antígenos particularmente preferidos incluyen:

- un antígeno diftérico, tal como un toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 3 de la ref.180].
- un antígeno tetánico, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 4 de la ref. 180].
- holotoxina tosferínica (*pertussis*, PT) y hemaglutinina filamentosa (*filamentous haemagglutinin*, FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, las refs. 181 & 182].
- el antígeno tosferínico celular.
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como el virus inactivado [por ejemplo, 183, 184].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de la superficie y/o el núcleo [por ejemplo, 184, 185], estando el antígeno superficial preferiblemente adsorbido sobre un fosfato de aluminio [186].
- preparaciones de microvesículas [187], 'OMVs naturales' [188], ampollas u otras vesículas de la membrana externa del serogrupo B de *N. meningitidis* [por ejemplo, las refs. 189 a 190 191 192 193 194 etc.]. Estas pueden prepararse a partir de bacterias que han sido manipuladas genéticamente [195-196 197 198], por ejemplo, para incrementar su inmunogenicidad (por ejemplo, hiperexpresan inmunógenos), para reducir la toxicidad, para inhibir la síntesis de los polisacáridos capsulares, para disminuir la expresión de PorA, etc. Pueden prepararse a partir de cepas que forman muchas ampollas [199-200 201 202]. Pueden incluirse vesículas de una *Neisseria* no patógena [203]. Las OMVs pueden prepararse sin el uso de detergentes [204,205]. Pueden expresar en su superficie proteínas que no son de *Neisseria* [206]. Pueden estar deplecionadas en LPS. Pueden mezclarse con antígenos recombinantes [189,207]. Pueden usarse vesículas

de bacterias con diferentes subtipos de proteínas de la membrana exterior de clase I, por ejemplo, seis subtipos diferentes [208,209] usando dos poblaciones de vesículas diferentes modificadas genéticamente que muestran cada una tres subtipos, o nueve subtipos diferentes usando tres poblaciones de vesículas diferentes modificadas genéticamente que muestran cada una tres subtipos, etc. Algunos subtipos útiles incluyen: P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1; P1.18-1,3,6.

- antígeno(s) de polio [por ejemplo, 210, 211] tales como IPV.

La mezcla puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales, que pueden estar destoxificados cuando sea necesario (por ejemplo, la destoxificación de la toxina tosferínica mediante un medio químico y/o genético).

Cuando se incluye un antígeno diftérico la mezcla también se prefiere incluir un antígeno tetánico y antígenos tosferínicos. De forma similar, cuando se incluye un antígeno tetánico se prefiere incluir también antígenos diftéricos y tosferínicos. De forma similar, cuando se incluye un antígeno tosferínico también se prefiere incluir antígenos diftéricos y tetánicos. Dichas combinaciones de DTP pueden usarse para reconstituir conjugados liofilizados.

Los antígenos de la mezcla están típicamente presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria frente a ese antígeno.

Como alternativa al uso de antígenos proteicos en la mezcla, puede usarse un ácido nucleico que codifica para el antígeno. Los componentes proteicos de la mezcla pueden sustituirse por tanto por ácidos nucleicos (preferiblemente ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifica para la proteína. De forma similar, las composiciones de la invención pueden comprender proteínas que mimetizan antígenos sacáridos, por ejemplo, mimótopos [212] o anticuerpos anti-idiotípicos. Éstos pueden sustituir a los componentes sacarinos individuales, o pueden complementarlos. Como ejemplo, la vacuna puede comprender un péptido mimético del polisacárido capsular de MenC [213] o de MenA [214] en lugar del propio sacárido.

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

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

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

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

Las composiciones de la invención pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo, sacarosa [215] o trehalosa [216]) por ejemplo, a aproximadamente 15-30 mg/ml (por ejemplo, 25 mg/ml), particularmente si van a ser liofilizados o si incluyen material que ha sido reconstituido a partir de material liofilizado. El pH de una composición para liofilización puede ajustarse hasta aproximadamente 6,1 antes de la liofilización.

La invención proporciona la composición descrita anteriormente, en la que la composición comprende adicionalmente sacarosa. Los sacáridos son preferiblemente oligosacáridos.

La composición puede estar en forma acuosa o seca (por ejemplo, liofilizada). Cuando está en forma acuosa, la concentración de sacarosa es preferiblemente de entre 5-50 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 25 mg/ml. Cuando esta forma liofilizada, se prefiere que la composición no incluya un coadyuvante de sal de aluminio. La composición puede comprender adicionalmente un antígeno de uno o más de (a) serogrupo B de *N. meningitidis*; (b) *Haemophilus influenzae* de tipo B; y/o (c) *Streptococcus pneumoniae*.

Inmunogenicidad

Las composiciones de la invención son inmunógenas. Las composiciones inmunógenas preferidas son las vacunas. Las vacunas según la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad tras la infección), pero típicamente serán profilácticas.

Las composiciones inmunógenas y las vacunas de la invención comprenderán, además de los antígenos descritos anteriormente, típicamente 'portadores farmacéuticamente aceptables', que incluyen cualquier portador que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los portadores adecuados son típicamente grandes macromoléculas de metabolismo lento tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, polímeros de aminoácidos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa, trehalosa [216], lactosa, agregados lipídicos (tales como gotitas oleosas o liposomas) y partículas de virus inactivos. Dichos portadores son bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Las vacunas también pueden contener diluyentes tales como agua, suero salino, glicerol, etc. Adicionalmente puede haber presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares.

Un portador típico es una disolución salina fisiológica estéril tamponada con fosfato exenta de pirógenos. Una detallada discusión sobre excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la ref. 217.

5 Las composiciones inmunógenas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de cada antígeno, así como cualquier otro de los componentes mencionados anteriormente, según sea necesario. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz', se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una única dosis o bien como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud, del estado físico del individuo que se va a tratar, de la edad, del grupo taxonómico que se va a tratar (por ejemplo, primates no humanos, seres humanos, etc.), de la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar los anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la valoración del médico responsable de la situación médica, y de otros factores relevantes. La cantidad está en el relativamente amplio intervalo que puede determinarse mediante ensayos rutinarios, y una cantidad típica de cada antígeno sacárido de meningococo por dosis está entre 1 µg y 20 µg por ejemplo, aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg (expresada como sacárido).

15 La inmunogenicidad de las composiciones de la invención puede determinarse administrándolas a sujetos de prueba (por ejemplo, niños de 12-16 meses de edad, o modelos animales [218]) y determinando después los parámetros estándar, incluyendo los anticuerpos bactericidas séricos (*serum bactericidal antibodies*, SBA) y los títulos de ELISA (GMT) de la IgG total y anti-cápsula de alta avidéz. Estas respuestas inmunitarias se determinarán generalmente alrededor de 4 semanas después de la administración de la composición, y se compararán con los valores determinados antes de la administración de la composición. Se prefiere un incremento en los SBA de al menos 4 veces o de 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, puede realizarse más de una determinación post-administración.

25 Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente que es superior al criterio de seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpos asociado por encima del cual un hospedador se considera seroconvertido frente al antígeno son bien conocidos, y dichos títulos están publicados por organizaciones tales como la WHO. Preferiblemente es seroconvertida más del 80% de una muestra estadísticamente significativa de sujetos, más preferiblemente más del 90%, aún más preferiblemente más del 93% y muy preferiblemente el 96-100%.

30 **Administración de las composiciones de la invención**

Las composiciones de la invención son inyectables.

La inyección parenteral puede ser subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular. Se prefiere la administración intramuscular en el muslo o la parte superior del brazo. La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse una inyección sin aguja. Un valor de dosis intramuscular típico es de 0,5 ml.

La administración puede ser en un programa de dosis única o en un programa de dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de recuerdo. Un programa de inmunización primaria puede estar seguido por un programa de dosis de recuerdo. La sincronización adecuada entre las dosis de cebado (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre cebado y recuerdo, pueden determinarse rutinariamente.

La administración se realizará generalmente a un animal, y en particular, pueden tratarse sujetos humanos. Las composiciones son particularmente útiles para vacunar a niños y adolescentes.

Usos médicos

45 La invención proporciona el uso en la elaboración de un medicamento inyectable para desencadenar una respuesta inmunitaria en un paciente, de una composición de la invención. La respuesta inmunitaria es preferiblemente protectora frente a una enfermedad meningocócica, y puede comprender una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular. El paciente es preferiblemente un niño.

El medicamento puede desencadenar una respuesta de recuerdo en un paciente que ya ha sido vacunado frente a *N. meningitidis*.

50 La invención también proporciona el uso de (i) sacáridos capsulares de al menos dos de los serogrupos A, C, W135 e Y de *N. meningitidis*, en el que dichos sacáridos capsulares están conjugados con proteína(s) portadora(s) y/o son oligosacáridos, y (ii) un antígeno de uno o más de (a) el serogrupo B de *N. meningitidis*; (b) *Haemophilus influenzae* de tipo B; y/o (c) *Streptococcus pneumoniae*, en la elaboración de un medicamento inyectable para desencadenar una respuesta inmunitaria en un animal. El medicamento es preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de la meningitis bacteriana.

55

Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección bacteriana tras la administración de la composición de la invención. Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar las respuestas inmunitarias frente a los antígenos administrados tras la administración de la composición.

5 **Hospedador heterólogo**

Aunque la expresión de los polipéptidos para su uso en las composiciones de la invención puede tener lugar en el hospedador natural (por ejemplo, en una *N. meningitidis* o en un *S. pneumoniae*), se usa preferiblemente un hospedador heterólogo. El hospedador heterólogo puede ser procariota (por ejemplo, una bacteria) o eucariota. Preferiblemente es *E. coli*, pero otros hospedadores adecuados incluyen *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, micobacterias (por ejemplo, *M. tuberculosis*), levaduras, etc.

General

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

15 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 exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

20 Las cepas bacterianas pueden indicarse como un subíndice, por ejemplo, 741_{MC58} es la proteína 741 de la cepa MC58. Salvo que se indique de otro modo, las proteínas mencionadas en este documento (por ejemplo, sin subíndice) son de la cepa 2996 de *N. meningitidis*, que puede tomarse como una cepa de 'referencia'. Se apreciará, sin embargo, que la invención no está limitada en general por la cepa. Según se mencionó anteriormente, las preferencias generales hacia una proteína (por ejemplo, '287', '919', etc.) pueden considerarse que incluyen esa proteína de cualquier cepa. Ésta tendrá típicamente una identidad de secuencia con 2996 del 90% o más (por ejemplo, del 91%, del 92%, del 93%, del 94%, del 95%, del 96%, del 97%, del 98%, del 99% o más). Cuando se usan proteínas híbridas, los antígenos individuales del híbrido (es decir, las fracciones individuales -X-) pueden ser de una o más cepas. Cuando $n = 2$, por ejemplo, X₂ puede ser de la misma cepa que X₁ o de una cepa diferente. Cuando $n=3$, las cepas podrían ser (i) $X_1 = X_2 = X_3$ (ii) $X_1 = X_2 \neq X_3$ (iii) $X_1 \neq X_2 = X_3$ (iv) $X_1 \neq X_2 \neq X_3$ o (v) $X_1 = X_3 \neq X_2$, etc.

30 El término "alquilo" se refiere a grupos alquilo en ambas formas, lineal y ramificada. El grupo alquilo puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 heteroátomos elegidos de entre -O-, -NH- o -S-. El grupo alquilo también puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 dobles y/o triples enlaces. Sin embargo, el término "alquilo" se refiere habitualmente a grupos alquilo con ninguna interrupción por heteroátomos ni interrupciones por dobles o triples enlaces. Cuando se hace referencia a un alquilo C₁₋₁₂, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 12 (por ejemplo, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). De forma similar, cuando se hace referencia a un alquilo C₁₋₆, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 6 (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆).

40 El término "cicloalquilo" incluye grupos cicloalquilo, policicloalquilo y cicloalqueno, así como combinaciones de éstos con grupos alquilo, tales como grupos cicloalquilalquilo. El grupo cicloalquilo puede estar interrumpido con 1, 2 ó 3 heteroátomos elegidos de entre -O-, -NH- o -S-. Sin embargo, el término "cicloalquilo" se refiere habitualmente a grupos cicloalquilo sin ninguna interrupción por heteroátomos. Algunos ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilometilo y grupos adamantilo. Cuando se hace referencia a un cicloalquilo C₃₋₁₂, se entiende que el grupo cicloalquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

45 El término "arilo" se refiere a un grupo aromático, tal como fenilo o naftilo. Cuando se hace referencia a un arilo C₅₋₁₂, se entiende que el grupo arilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 5 y 12 (por ejemplo, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

El término "arilo C₅₋₁₂- alquilo C₁₋₆" se refiere a grupos tales como bencilo, feniletilo y naftilmetilo.

50 Los grupos protectores de nitrógeno incluyen grupos sililo (tales como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acilo (tales como ftalimidias, trifluoroacetamidias, 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 [3-trimetilsililetansulfonilo (SES)), derivados de sulfenilo, alquilo C₁₋₁₂, bencilo, benzhidrido, tritilo, 9-fenilfluorenilo etc. Un grupo protector de nitrógeno preferido es Fmoc.

55 Se apreciará que pueden existir anillos de azúcar en forma abierta y cerrada y que, mientras que las formas

cerradas se muestran en las fórmulas estructurales de este documento, las formas abiertas también están englobadas por la invención.

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

- 5 Los polipéptidos de la invención pueden prepararse mediante diversos medios (por ejemplo, expresión recombinante, purificación a partir de un cultivo celular, síntesis química (al menos en parte), etc.) y de varias formas (por ejemplo, natural, fusiones, no glucosilada, lipidada, etc.). Preferiblemente se preparan en una forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente exentos de cualquier otra proteína de *N. meningitidis* o de la célula hospedadora).
- 10 El ácido nucleico según la invención puede prepararse de muchas formas (por ejemplo, mediante síntesis química (al menos en parte), a partir de genotecas de ADN genómico o ADNc, a partir del propio organismo, etc.), y puede tener varias formas (por ejemplo, monocatenario, bicatenario, vectores, sondas, etc.). Preferiblemente se prepara en una forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente exento de otros ácidos nucleicos de *N. meningitidis* o de la célula hospedadora). El término "ácido nucleico" incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tales como los que
- 15 contienen esqueletos modificados (por ejemplo, fosforotioatos, etc.), y también ácidos nucleicos peptídicos (*peptide nucleic acids*, PNA) etc. La invención incluye un ácido nucleico que comprende secuencias complementarias a las descritas anteriormente (por ejemplo, con propósitos antisentido o como sonda).

- Después del serogrupo, la clasificación de los meningococos incluye el serotipo, el serosubtipo y después el inmunotipo, y la nomenclatura estándar enumera serogrupo, serotipo, serosubtipo, inmunotipo, separados cada uno por una coma, por ejemplo, B:4:P1.15:L3,7,9. Dentro del serogrupo B, algunos linajes provocan a menudo enfermedades (hiper-invasivos), algunos linajes causan formas más graves de la enfermedad que otros (hipervirulentos), y otros raramente causan alguna enfermedad. Se han reconocido siete linajes hipervirulentos, a saber, los subgrupos I, III y IV-1, el complejo ET-5, el complejo ET-37, el agregado A4 y el linaje 3. Éstos se han
- 20 definido mediante electroforesis enzimática multilocus (flee), pero también se ha usado el tipado de secuencia multilocus (*multilocus sequence typing*, MLST) para clasificar a los meningococos [ref. 41].
- 25

Modos de llevar a cabo la invención

1. Composiciones de sacáridos de meningococos para la administración intramuscular a seres humanos

- Se prepararon conjugados de oligosacáridos de MenC, MenW135, MenY y, opcionalmente, de MenA, según se desvela en la referencia 7. Estos se usaron para preparar dosis individuales de 0,5 ml de las siguientes seis
- 30 composiciones (cantidades por dosis de 0,5 ml):

Componente	A*	B	C*	D*	E*	F
Conjugado de oligosacárido de serogrupo A-CRM ₁₉₇ µg	10	0	10	5	2,5	0
Conjugado de oligosacárido de serogrupo C-CRM ₁₉₇ µg	10	10	5	5	2,5	10
Conjugado de oligosacárido de serogrupo W135-CRM ₁₉₇ µg	10	10	5	5	2,5	0
Conjugado de oligosacárido de serogrupo Y-CRM ₁₉₇ µg	10	10	5	5	2,5	0
Cuadrante de fosfato de aluminio mg	0,3					
Cloruro sódico mg	4,5					
Manitol mg	7,5					
Fosfato sódico monobásico (pH 7,6) mg	0,69					
Dihidrogenofosfato potásico mg	0,34					
Tween™ 80 mg	0,025					
* el componente del serogrupo A está en forma liofilizada y se diluyó con una composición líquida CWY para dar la composición final ACWY,						

- Estas vacunas se administran mediante inyección intramuscular en la región del muslo de niños de 12-16 meses, bien en una única dosis (lo que es eficaz para Menjugate™ en niños >12 meses) o bien, una segunda inyección 4 semanas después. Los BCA e IgG séricos pueden compararse antes y después de la vacunación (por ejemplo, a las
- 35 4 semanas, y después a las 8 semanas si se reciben dos dosis).

2. Composición en dos viales

Se prepararon conjugados para uso humano en dos viales o individuales. El vial 1 contenía un polvo liofilizado de conjugado de MenA, con sacarosa y dihidrogenofosfato sódico. El vial 2 contenía los conjugados MenC, MenW135 y MenY, con cloruro sódico, polisorbato 80, tampón de fosfato sódico y un coadyuvante opcional de fosfato de aluminio, que está presente en suspensión. Antes de su uso, el vial 1 es reconstituido con 0,6 ml de líquido del vial 2, para dar 0,5 ml disponibles para su administración.

Se prepararon tres dosis. En su forma reconstituida, las vacunas contenían los antígenos como sigue:

Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
Conjugado del serogrupo A	10 µg de sacárido + 12,5-33 µg de CRM ₁₉₇ ó 5 µg de sacárido + 6,25-16,5 µg de CRM ₁₉₇ ó 2,5 µg de sacárido + 3,125-8,25 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo C	10 µg de sacárido + 12,5-25 µg de CRM ₁₉₇ ó 5 µg de sacárido + 6,25-12,5 µg de CRM ₁₉₇ ó 2,5 µg de sacárido + 3,125-6,25 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo W135	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇ ó 5 µg de sacárido + 3,3-10 µg de CRM ₁₉₇ ó 2,5 µg de sacárido + 1,65-5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo Y	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇ ó 5 µg de sacárido + 3,3-10 µg de CRM ₁₉₇ ó 2,5 µg de sacárido + 1,65-5 µg de CRM ₁₉₇

En su forma reconstituida, las vacunas contenían otros componentes como sigue:

Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml	
Coadyuvante de fosfato de aluminio	0,3 mg como Al ⁺³	cero
Dihidrogenofosfato sódico	1 mM	2,5 mM
Hidrogenofosfato disódico dihidratado	9 mM	7,5 mM
Tampón de fosfato sódico	10 mM	
Dihidrogenofosfato potásico	5 mM	
Tween™ 80 (tensioactivo)	0,025 mg	
Cloruro sódico (tonicidad)	4,5 mg	
Sacarosa (liofilización y tonicidad)	12,5 mg	
Agua para inyección	Hasta el volumen final	

Por lo tanto había disponibles seis vacunas - tres dosis diferentes (10, 20 ó 40 µg de sacárido total), cada una con o sin coadyuvante de fosfato de aluminio.

Se administró la vacuna con coadyuvante con la mayor dosis de sacárido a sujetos humanos sanos de entre 18-45 años. Para comparar, los sujetos de control recibieron bien (a) los productos del vial 1 (reconstituido con tampón) y del vial 2 en diferentes brazos al mismo tiempo, o bien (b) Mencevax™. Cada grupo de pacientes contiene 30 personas.

Se recogió sangre antes y 28 días después de la vacunación para evaluar la respuesta inmunitaria y para recoger

parámetros de seguridad del laboratorio (recuento sanguíneo completo, análisis de bioquímica sanguínea, pruebas de función hepática y renal y análisis de orina). La vacuna era bien tolerada, sin ninguna reacción adversa inesperada. No se produjeron cambios anormales significativos en los parámetros de laboratorio durante el estudio.

5 Se determinaron los SBA e IgG específicos de los serogrupos A, C, W-135, Y (medidos mediante ELISA) en las muestras séricas. Los títulos de SBA se expresaron como el recíproco de la dilución sérica final, dando $\geq 50\%$ de destrucción a los 60 minutos. Para la medición de la IgG se realizó un ELISA modificado para ensayar los anticuerpos de alta avidéz. Para la detección de anticuerpos funcionales se usaron SBAs con dos fuentes exógenas diferentes de complemento: una fuente de complemento de cría de conejo y una fuente de complemento humana.

10 Los resultados de la IgG de alta avidéz fueron como sigue (GMC medias ($\mu\text{g/mL}$) con intervalos de confianza del 95%):

Serogrupo	Suero	Grupo vacunal		
		ACWY	A+CWY	Mencevax™
A	Pre	0,67 (0,3-1,2)	0,85 (0,4-1,5)	0,45 (0,2-0,8)
	Post	10 (6,6-16)	14 (8,8-22)	9,8 (6,2-15)
C	Pre	0,21 (0,1-0,3)	0,13 (0,07-0,2)	0,16 (0,1-0,2)
	Post	7,7 (4,7-13)	5,2 (3,19-8,46)	8,5 (5,2-14)
W-135	Pre	0,21 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,3)	0,29 (0,19-0,4)
	Post	12 (6,5-21)	9 (5,5-18)	6,7 (3,7-12)
Y	Pre	0,35 (0,2-0,5)	0,31 (0,1-0,5)	0,57 (0,3-0,9)
	Post	18 (12-29)	21 (13-33)	20 (12-31)

Los resultados de los SBA fueron como sigue (% de respondedores y GMT media, ambos con un IC del 95%):

Serogrupo	Grupo vacunal	SBA del complemento de conejo		SBA del complemento humano	
		Títulos $\geq 1:128$ (%)	GMT	Títulos $\geq 1:4$ (%)	GMT
A	ACWY	93 (78-99)	989 (558-1754)	90 (73-98)	42 (23-76)
	A + CWY	97 (83-100)	2566 (1448-4549)	97 (83-100)	66 (36-119)
	Mencevax	100 (88-100)	3132(1767-5552)	83 (65-94)	28 (15-50)
C	ACWY	97 (82-100)	4480 (2455-8176)	100 (88-100)	213 (106-427)
	A + CWY	100 (88-100)	3794 (2100-6855)	100 (88-100)	162 (80-325)
	Mencevax	93 (78-99)	3829 (2119-6918)	100 (88-100)	223 (111-448)
W-135	ACWY	10,0 (88-100)	10343 (5988-17865)	100 (88-100)	248 (123-500)
	A + CWY	100(88-100)	10376 (6007-17923)	93 (78-99)	142 (71-287)
	Mencevax	100 (88-100)	6795 (3934-11737)	97 (83-100)	99 (49-199)
Y	ACWY	100 (88-100)	22075 (14689-33175)	100 (88-100)	263 (151-457)
	A + CWY	100 (88-100)	24034 (15993-36120)	100 (88-100)	162 (194-588)
	Mencevax	100 (88-100)	14630 (9735-21987)	100 (88-100)	198 (114-344)

15 Para cada serogrupo y en cada grupo vacunal (ACWY, A + CWY y control de Mencevax), las GMCs de la IgG anti-capsular de alta avidéz mediante ELISA y la GMT de los SBA medidos con los ensayos de complemento de conejo y humano, aumentaron tras la inyección. En el día 29 tras la inyección de la vacuna, el porcentaje de sujetos con

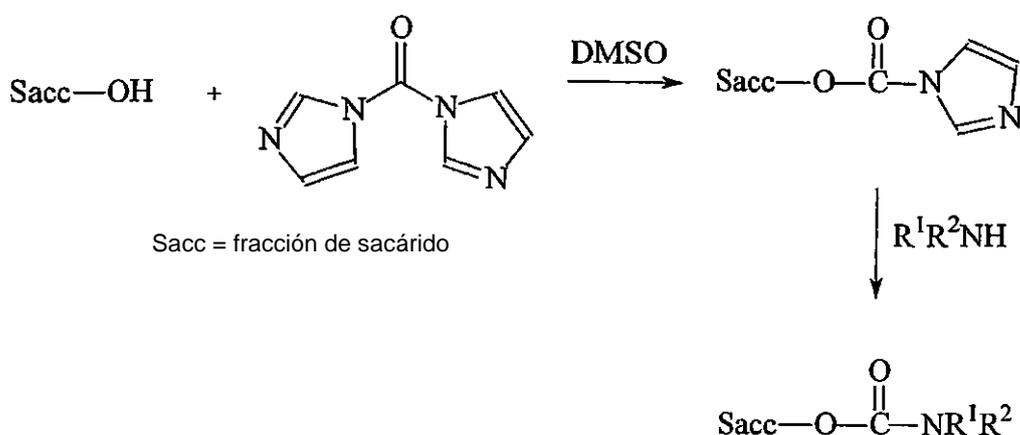
títulos de SBA de complemento humano > 1:4 para cada grupo variaba entre el 90%-100% en las vacunas conjugadas y entre el 83%-100% en el grupo de control. Usando la fuente de complemento de conejo, el porcentaje de sujetos con títulos de SBA > 1:128 para cada serogrupo variaba entre el 93%-100% para las vacunas conjugadas y entre el 90%-100% para el grupo de control.

- 5 Globalmente, las respuestas inmunitarias (GMC y GMT) eran mejores en los grupos con conjugados que en el grupo de control con Mencevax. La mejora se observó especialmente con el serogrupo W-135. Las vacunas conjugadas de la invención son por lo tanto seguras, bien toleradas e inducen respuestas inmunitarias funcionales iguales o mejores a las observadas tras la inmunización con una vacuna de polisacáridos tetravalente autorizada.

3. Uso de sacárido modificado de MenA

- 10 Se purificó el polisacárido de MenA y se hidrolizó para dar oligosacárido de MenA. El polisacárido (2 g) se hidrolizó a 50°C en tampón de acetato sódico 50 mM, pH 4,75, a una concentración de polisacárido de 10 mg/mL durante aproximadamente 4 horas [73]. Tras 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 para dar una concentración de sacárido de 10 mg/mL. Según una proporción molar de oligosacárido:CDI de 1:20, se añadieron después 21,262 g de CDI y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El compuesto resultante de MenA-CDI se purificó mediante una precipitación selectiva en una mezcla 80:20 (v/v) de acetona:DMSO seguido de una centrifugación. La eficacia de la reacción de activación se calculó en aproximadamente el 67,9% mediante la determinación de la proporción entre el imidazol libre y el imidazol unido.
- 20

En la segunda etapa de la reacción, se solubilizó el oligosacárido MenA-CDI en DMSO a una concentración de sacárido de aproximadamente 10 mg/mL. Según una proporción molar de unidad de MenA-CDI:DMA de 1:100, se añadieron 36,88 g de clorhidrato de dimetilamina al 99% (es decir, R¹ & R² = Me) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El producto de reacción se liofilizó y se resolubilizó en una disolución de agua de 10 mg/mL.

25

- Para eliminar el reactivo de bajo peso molecular de la reacción (en particular, la dimetilamina (DMA)) de la preparación de oligosacárido, se realizó una etapa de diálisis a través de una membrana de 3,5 kDa de MWCO (Spectra/Por™). Se llevaron a cabo cuatro etapas de diálisis: (i) 16 horas frente a 2 L de cloruro sódico 1 M (factor de diálisis 1:20), (ii) 16 horas frente a 2 L de cloruro sódico 0,5 M (factor de diálisis 1:20), (iii) y (iv) 16 horas frente a 2 L de WFI (factor de diálisis 1:20). Para mejorar la purificación también se llevó a cabo una etapa de diafiltración realizada a través de una membrana de 1 kDa de MWCO (Centricon™).
- 30

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

Para preparar los conjugados del sacárido modificado de MenA (MenA-CDI-DMA), el proceso global fue como sigue:

- hidrólisis del polisacárido para dar fragmentos de oligosacárido
- 35 - dimensionamiento de los fragmentos de oligosacárido
- aminación reductora de los grupos aldehído terminales de los oligosacáridos dimensionados
- protección de los grupos -NH₂ terminales con un grupo Fmoc antes de la reacción con CDI
- desprotección intrínseca de los grupos -NH₂ durante la reacción con DMA

- activación de los grupos -NH₂ terminales con SIDEA (ácido N-hidroxisuccinimida adípico)
- unión covalente a una proteína CRM₁₉₇.

5 El conjugado de oligosacárido de MenA modificado era mucho más resistente a la hidrólisis que su contrapartida natural a elevadas temperaturas. Por ejemplo, después de 28 días a 37°C, el porcentaje de sacárido liberado es del 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 inferiores que los obtenidos usando las estructuras de los azúcares naturales.

El conjugado modificado de MenA se combina con conjugados de MenC, MenW135 y MenY como sustituto para el conjugado de oligosacárido no modificado.

10 4. Adición de antígenos de MenB

Antes de la reconstitución del conjugado liofilizado de MenA según se describió anteriormente, se añaden los antígenos de MenB AG287-953 (ID. SEC. N°: 7), 936-AG741 (ID. SEC. N°: 8) y NadA (ID. SEC. N°: 2) a la mezcla líquida de dosis más alta de C-W135-Y, para dar una concentración final de 20 µg/dosis para cada uno de los tres polipéptidos. La vacuna reconstituida contiene por tanto los siguientes antígenos:

Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
Conjugado del serogrupo A	10 µg de sacárido + 12,5-33 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo C	10 µg de sacárido + 12,5-25 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo W135	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo Y	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇
AG287-953	20 µg de polipéptido
936-A741	20 µg de polipéptido
NadA	20 µg de polipéptido

15

5. Adición de antígeno de Hib

El conjugado liofilizado de HbOC se mezcla con el conjugado liofilizado de MenA y ambos son reconstituidos conjuntamente mediante la mezcla líquida C-W135-Y para dar la siguiente vacuna:

Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
Conjugado del serogrupo A	10 µg de sacárido + 12,5-33 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo C	10 µg de sacárido + 12,5-25 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo W135	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo Y	10 µg de sacárido + 6,6-20 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del HbOC de Hib	10 µg de sacárido + 2-5 µg de CRM ₁₉₇

20 6. Adición de antígenos de neumococos

Antes de la reconstitución del conjugado liofilizado de MenA según se describió anteriormente, se añaden antígenos conjugados de neumococos a la mezcla líquida de dosis media C-W135-Y para dar una concentración final de 2 µg/dosis para cada uno de los serotipos (doble para el serotipo 6B). La vacuna reconstituida contiene por tanto los siguientes antígenos:

Componente	Cantidad por dosis de 0,5 ml
Conjugado del serogrupo A	5 µg de sacárido + 6,25-16,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo C	5 µg de sacárido + 6,25-12,5 µg de CRM ₁₉₇

Conjugado del serogrupo W135	5 µg de sacárido + 3,3-10 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo Y	5 µg de sacárido + 3,3-10 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serogrupo 4 de <i>Pneumococcus</i>	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serotipo 9V de <i>Pneumococcus</i>	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serotipo 14 de <i>Pneumococcus</i>	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serotipo 18C de <i>Pneumococcus</i>	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serotipo 19F de <i>Pneumococcus</i>	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serotipo 23F de <i>Pneumococcus</i>	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado del serotipo 6B de <i>Pneumococcus</i>	4 µg de sacárido + 5 µg de CRM ₁₉₇

Se entenderá que la invención se ha descrito únicamente a modo de ejemplo, y que pueden realizarse modificaciones permaneciendo en el alcance de las reivindicaciones anexas.

REFERENCIAS (el contenido de las cuales se incorpora al presente documento en su totalidad)

- 5 [1] Capítulo 28 de Vacunas (Plotkin & Orenstein) 3ª edición (1999) ISBN 0-7216-7443-7.
 [2] Armand y col. (1982) J. Biol. Stand. 10: 335-339.
 [3] Cadoz y col. (1985) Vaccine 3: 340-342.
 [4] MMWR (1997) 46 (RR-5) 1-10.
 [5] Baklaic y col. (1983) Infect. Immun. 42: 599-604.
- 10 [6] Documento WO02/058737.
 [7] Documento WO03/007985.
 [8] Rennels y col. (2002) Pediatr Infect Dis J 21: 978-979.
 [9] Campbell y col. (2002) J Infect Dis 186: 1848-1851.
 [10] Costantino y col. (1992) Vaccine 10: 691-698.
- 15 [11] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2: 47-49.
 [12] Documento WO02/00249.
 [13] Documento WO97/28273.
 [14] Lieberman y col. (1996) JAMA 275: 1499-1503.
 [15] Frash (1990) págs.123-145 de Advances in Biotechnological Processes vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- 20 [16] Inzana (1987) Infect. Immun. 55: 1573-1579.
 [17] Kandil y col. (1997) Glycoconj J 14: 13-17.
 [18] Berkin y col. (2002) Chemistry 8: 4424-4433.
 [19] Documento WO03/080678.
 [20] Documento WO98/08543.
- 25 [21] Tettelin y col. (2000) Science 287: 1809-1815.
 [22] Pizza y col. (2000) Science 287: 1816-1820.
 [23] Documento WO99/24578.
 [24] Documento WO99/36544.

- [25] Documento WO99/57280.
- [26] Documento WO00/22430.
- [27] Documento WO00/66791.
- [28] Documento WO00/66741.
- 5 [29] Documento WO01/64920.
- [30] Documento WO01/64922.
- [31] Documento WO03/020756.
- [32] Solicitudes de patente del Reino Unido 0223741.0, 0305831.0 & 0309115.4, y solicitud internacional PCT/IB03/04848.
- 10 [33] Comanducci y col. (2002) J. Exp. Med. 195: 1445-1454.
- [34] Documento WO03/010194.
- [35] Parkhill y col. (2000) Nature 404: 502-506.
- [36] Solicitud de patente internacional PCT/IB03/06320.
- [37] Documento WO03/063766.
- 15 [38] Massignani y col. (2003) J Exp Med 197: 789-799.
- [39] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
- [40] Pettersson y col. (1994) Microb Pathog 17(6): 395-408.
- [41] Maiden y col. (1998) PNAS USA 95: 3140-3145.
- 20 [42] Welsch y col. (2002) Decimotercera Conferencia Internacional sobre Neisseria Patógena, Instituto Noruego de Salud Pública, Oslo, Noruega; 1-6 de septiembre de 2002. Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C Neisseria meningitidis strains.
- [43] Santos y col. (2002) Decimotercera Conferencia Internacional sobre Neisseria Patógena, Instituto Noruego de Salud Pública, Oslo, Noruega; 1-6 de septiembre de 2002. Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of N. meningitidis.
- 25 [44] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2: S28-36.
- [45] Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34: 163-168.
- [46] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13: 113-33, vii.
- [47] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47: 563-567.
- [48] Patente Europea 0477508.
- 30 [49] Patente de EE.UU. 5.306.492.
- [50] Documento WO98/42721.
- [51] Dick y col. en Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, 10: 48-114.
- [52] Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [53] Kanra y col. (1999) The Turkish Journal of Paediatrics 42: 421-427.
- 35 [54] Ravenscroft y col. (2000) Dev Biol (Basel) 103: 35-47.
- [55] Documento WO97/00697.
- [56] Documento WO96/37222; Patente de EE.UU. 6.333.036.
- [57] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19: 331-332.
- [58] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47: 269-285, v.

- [59] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 187-207.
- [60] Zielen y col. (2000) *Infect. Immun.* 68: 1435-1440.
- [61] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4: 609-630.
- [62] Tettelin y col. (2001) *Science* 293: 498-506.
- 5 [63] Hoskins y col (2001) *J Bacteriol* 183: 5709-5717.
- [64] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3: 445-450
- [65] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19: 2688-2691.
- [66] Masignani y col. (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2: 895-905.
- [67] Mora y col. (2003) *Drug Discov Today* 8: 459-464.
- 10 [68] Wizemann y col. (2001) *Infect Immun* 69: 1593-1598.
- [69] Rigden y col. (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38: 143-168.
- [70] Documento WO02/22167.
- [71] Nilsson & Svensson (1979) *Carbohydrate Research* 69: 292-296)
- [72] Ravenscroft y col. (1999) *Vaccine* 17: 2802-2816.
- 15 [73] Costantino y col. (1999) *Vaccine* 17: 1251-1263.
- [74] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357 (9251): 195-196.
- [75] Anónimo (enero de 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [76] Anderson (1983) *Infect Immun* 39 (1): 233-238.
- [77] Anderson y col. (1985) *J Clin Invest* 76 (1): 52-59.
- 20 [78] Documento EP-A-0372501.
- [79] Documento EP-A-0378881.
- [80] Documento EP-A-0427347.
- [81] Documento WO93/17712
- [82] Documento WO94/03208.
- 25 [83] Documento WO98/58668.
- [84] Documento EP-A-0471177.
- [85] Documento WO91/01146
- [86] Falugi y col. (2001) *Eur J Immunol* 31: 3816-3824.
- [87] Documento EP-A-0594610.
- 30 [88] Documento WO00/56360.
- [89] Documento WO02/091998.
- [90] Documento WO01/72337
- [91] Documento WO00/61761.
- [92] Documento WO99/42130
- 35 [93] Documento WO96/40242
- [94] Lees y col. (1996) *Vaccine* 14: 190-198.
- [95] Documento WO95/08348.

- [96] Patente de EE.UU. 4.882.317
- [97] Patente de EE.UU. 4.695.624
- [98] Porro y col. (1985) Mol Immunol 22: 907-919.
- [99] Documento EP-A-0208375
- 5 [100] Documento WO00/10599
- [101] Gever y col. Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
- [102] Patente de EE.UU. 4.057.685.
- [103] Patentes de EE.UU. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [104] Patente de EE.UU. 4.459.286.
- 10 [105] Patente de EE.UU. 4.965.338.
- [106] Patente de EE.UU. 4.663.160.
- [107] Patente de EE.UU. 4.761.283
- [108] Patente de EE.UU. 4.356.170
- [109] Lei y col. (2000) Dev Biol (Basel) 103: 259-264.
- 15 [110] Documento WO00/38711; Patente de EE.UU. 6.146.902.
- [111] Documento WO03/009869.
- [112] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [113] Documento WO00/23105.
- [114] Documento WO90/14837.
- 20 [115] Patente de EE.UU. 5.057.540.
- [116] Documento WO96/33739.
- [117] Documento EP-A-0109942.
- [118] Documento WO96/11711.
- [119] Documento WO00/07621.
- 25 [120] Barr y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32: 247-271.
- [121] Sjolanderet y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32: 321-338.
- [122] Niikura y col. (2002) Virology 293: 273-280.
- [123] Lenz y col. (2001) J Immunol 166: 5346-5355.
- [124] Pinto y col. (2003) J Infect Dis 188: 327-338.
- 30 [125] Gerber y col. (2001) Virol 75: 4752-4760.
- [126] Documento WO03/024480
- [127] Documento WO03/024481
- [128] Gluck y col. (2002) Vaccine 20: B10-B16.
- [129] Documento EP-A-0689454.
- 35 [130] Johnson y col. (1999) BioorgMed Chem Lett 9: 2273-2278.
- [131] Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2: 219-229.
- [132] Meraldi y col. (2003) Vaccine 21: 2485-2491.

- [133] Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21: 836-842.
- [134] Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31: 2393-2400.
- [135] Documento WO02/26757.
- [136] Documento WO99/62923.
- 5 [137] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9: 831-835.
- [138] McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32: 179-185.
- [139] Documento WO98/40100.
- [140] Patente de EE.UU. 6.207.646.
- [141] Patente de EE.UU. 6.239.116.
- 10 [142] Patente de EE.UU. 6.429.199.
- [143] Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3): 654-658.
- [144] Blackwell y col. (2003) *J Immunol* 170: 4061-4068.
- [145] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23: 64-65.
- [146] Documento WO01/95935.
- 15 [147] Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306: 948-953.
- [148] Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300: 853-861.
- [149] Documento WO03/035836.
- [150] Documento WO95/17211.
- [151] Documento WO98/42375.
- 20 [152] Beignon y col. (2002) *Infect Immun* 70: 3012-3019.
- [153] Pizza y col. (2001) *Vaccine* 19: 2534-2541.
- [154] Pizza y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290: 455-461.
- [155] Scharton-Kersten y col. (2000) *Infect Immun* 68: 5306-5313.
- [156] Ryan y col. (1999) *Infect Immun* 67: 6270-6280.
- 25 [157] Partidos y col. (1999) *Immunol Lett* 67: 209-216.
- [158] Peppoloni y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2: 285-293.
- [159] Pine y col. (2002) *J Control Release* 85: 263-270.
- [160] Domenighini y col. (1995) *Mol Microbiol* 15: 1165-1167.
- [161] Documento WO99/40936.
- 30 [162] Documento WO99/44636.
- [163] Singh y col] (2001) *J Cont Release* 70: 267-276.
- [164] Documento WO99/27960.
- [165] Patente de EE.UU. 6.090.406
- [166] Patente de EE.UU. 5.916.588
- 35 [167] Documento EP-A-0626169.
- [168] Documento WO99/52549.
- [169] Documento WO01/21207.

- [170] Documento WO01/21152.
- [171] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19: 109-115.
- [172] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31: 185-196.
- [173] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27: 571-577.
- 5 [174] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4: 214-218.
- [175] Documento WO99/11241.
- [176] Documento WO94/00153.
- [177] Documento WO98/57659.
- [178] Solicitudes de Patente Europea 0835318, 0735898 y 0761231.
- 10 [179] Documento WO96/14086.
- [180] *Vaccines* (eds. Plotkin & Mortimer), 1988. ISBN: 0-7216-1946-0
- [181] Gustafsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334: 349-355.
- [182] Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9: 232-238.
- [183] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19: 1187-1188.
- 15 [184] Iwarson (1995) *APMIS* 103: 321-326.
- [185] Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Supl.: S63-68 & 79-80.
- [186] Documento WO93/24148.
- [187] Documento WO02/09643.
- [188] Katial y col. (2002) *Infect Immun* 70: 702-707.
- 20 [189] Documento WO01/52885.
- [190] Patente europea 0301992.
- [191] Bjune y col. (1991) *Lancet* 338 (8775): 1093-1096.
- [192] Fukasawa y col. (1999) *Vaccine* 17: 2951-2958.
- [193] Documento WO02/09746.
- 25 [194] Rosenqvist y col. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92: 323-333.
- [195] Documento WO01/09350.
- [196] Patente europea 0449958.
- [197] Documento EP-A-0996712.
- [198] Documento EP-A-0680512.
- 30 [199] Documento WO02/062378.
- [200] Documento WO99/59625.
- [201] Patente de EE.UU. 6.180.111.
- [202] Documento WO01/34642.
- [203] Documento WO03/051379.
- 35 [204] Patente de EE.UU. 6.558.677
- [205] Documento PCT/IB03/04293.
- [206] Documento WO02/062380.

- [207] Documento WO00/25811.
- [208] Peeters y col. (1996) *Vaccine* 14: 1008-1015.
- [209] Vermont y col. (2003) *Infect Immun* 71: 1650-1655.
- [210] Sutter y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 287-308.
- 5 [211] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59: 113-118, 125-126.
- [212] Charalambous & Feavers (2001) *J Med Microbiol* 50: 937-939.
- [213] Westerink (2001) *Int Rev Immunol* 20: 251-261.
- [214] Grothaus y col. (2000) *Vaccine* 18: 1253-1263.
- [215] Paoletti y col. (2001) *Vaccine* 19: 2118-2126.
- 10 [216] Documento WO00/56365.
- [217] Gennaro (2000) Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª ed., ISBN: 0683306472
- [218] Documento WO01/30390.

LISTADO DE SECUENCIAS

ID. SEC. Nº 1 - *Nada de la cepa 2996 con una delección C-terminal*

MKHÉPSKVLTTAILATFCSGALAAATNDDDVKKAATVAIAAAAYNNGQEINGFKAGETIYDI DE DGTITKKDATAADVEADDF
 RGLGLKKVVTNLTKTVNENKQNVDAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNAINKLGENTTFEABETKTNIY
 KIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKAEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAETAAGKAEAAAGTANTPAAD
 KAEVAAKVTDIKADIATNKDNIACKANSADVYTREESDSKPVRI DGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDKTVS
 DLRKETROGLAEQAALSGLFPYVNG

ID. SEC. Nº 2 - *Nada de la cepa 2996 con una delección C-terminal y el péptido líder procesado*

ATNDDDVKKAATVAIAAAAYNNGQEINGFKAGETIYDI DE DGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVNENKQNV
 DAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNAINKLGENTTFEABETKTNIYKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDI
 ADSLDETNTKAEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAETAAGKAEAAAGTANTPAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNI
 ACKANSADVYTREESDSKPVRI DGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDKTVS DLRKETROGLAEQAALSGLFPY
 NVG

ID. SEC. Nº 3 - *ΔG741 de la cepa M58*

VAADIGAGLADALTAFLDHKDKGLQSLTL DQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFTROI EVDGQL
 ITLESGEFQVYKQSHSALTAFOQTEQIQDSEHSGKMKVAKQFRI GDIAGEHTSFQKLEPGEGRATYRGTAFGSDDAGGKLYT
 IDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADI KPDGKRHAVI SGVLYNQAEKGSYS LGI FGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIG
 LAAKQ

ID. SEC. Nº 4 - *936 de la cepa M58 con el péptido líder procesado*

VS AVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQRNNQTKGYTPQLSVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVQ
 IARSEQAAGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRA TL LGISPATQARVKI VTYGNVTYVMGILIPPEQAQITQKRVST
 TVGVQKVI TLYQNYVQR

ID. SEC. Nº 5 - *953 de la cepa M58 con el péptido líder procesado*

ATYKVDEYHANARFAI DHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKI DITIPVANLQSGSQHETDHLKSADIFDAAQYPIR
 FVSTKFNFNKGLVSDGNLTMHGKTA PVKLEKFKNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGMVYLVNVGMTKSVRIDIQ
 IEAAKQ

ID. SEC. Nº 6 - *ΔG287 de la cepa M58*

SPDVKASDTLSKPAAPVSEKETEAKEDAPQAGSQGQAPSAQGSQDMAAVSEENTGNGGAVTADNPKNEDEVAQN DMPQN
 AAGTDSSTPNHTPDPNMLACNMENQATDAGES SQPANQPDMAANAADGMQGDPSAGGQNAAGNTAAQGANQAGNNQAGSSD
 EIPASNPAPANGGSNFRVLDLANGVLI DGPSQNI TLTHCKGDS CSGNNFLDEEVQLKSEFEKLS DADKISNYKKDKGNDKF
 VGLVADSVQMKGINQYII FYKPKPTS FARFRSARSRRSL PAEMPLI PVNQADTLIVDGEAVSLTGHSNIFAPEGNRYL
 TYGAEKLPGGSYALRVQGEPAKGEMLAGA AVYNGEVLHFTENGRFPYPTGRFAAKVDFGSKSV DGI IDS GDDLHMGTKF
 KAAIDGNGFKGTWTENGSGDVSCKFYGPAGEVAGKYSYRPTDAEKGGFV FAKKQD

ID. SEC. Nº 7 - *hibrido 287-953*

MASEDVKASDTLSKPAAPVSEKETEAKEDAPQAGSQGQAPSAQGSQDMAAVSEENTGNGGAAATDKPKNEDEGAQN DMP
 QNAADTDSLTPNHTPASNNPAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMAANTADGMQGDPSAGGENAGNTAAQGTNQAENNTAGS
 QNPASSTNPSATNSGGDFGRTNVGNVVDGSPQNI TLTHCKGDS CSGNNFLDEEVQLKSEFEKLS DADKISNYKKDKGND
 GKNDKFPVGLVADSVQMKGINQYII FYKPKPTS FARFRSARSRRSL PAEMPLI PVNQADTLIVDGEAVSLTGHSNIFAPE
 GNRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPAKGEMLAGTAVYNGEVLHFTENGRPSPSRGRFAAKVDFGSKSV DGI IDS GDDLH
 MGTQKFKAAIDGNGFKGTWTENGSGDVSCKFYGPAGEVAGKYSYRPTDAEKGGFV FAKKQD CGSGCGATYKVDEYHA
 NARFAI DHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKI DITIPVANLQSGSQHETDHLKSADIFDAAQYPIR FVSTKFNFNK
 KGLVSDGNLTMHGKTA PVKLEKFKNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGMVYLVNVGMTKSVRIDIQ IEAAKQ*

ID. SEC. Nº 8 - híbrido 936-174

MVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLILLGQVATEGEKQFVG
QIARSEQAAGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYVMGILTPEEQAQITQKVS
TTVGVQKVIITLYQNYVQRGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSL
TGKLNKDKVSRFDQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMAKROFRIGDIAGEHTSFDKLP
EGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGI
FGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ*

ID. SEC. Nº 9 - conector

GSGGGG

ID. SEC. Nº 10 - proteína 741 de la cepa M58

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMAKROFRIGDIAGEHTSFDKLP
EGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGI
FGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

ID. SEC. Nº 11 - proteína 741 de la cepa 2996

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS
AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAQYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTP
EQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGE
KVHEIGIAGKQ

ID. SEC. Nº 12 - proteína 741 de la cepa m1239

CSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTITLSAQAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKDKI
SRFDQIEVDGQITITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAQYHGK
AFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAG
SATVKIGEKVHEIGIAGKQ

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunógena inyectable que comprende sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*, en la que: (i) dichos sacáridos capsulares están conjugados con una proteína portadora para dar conjugados individuales para cada uno de los cuatro serogrupos; (ii) los conjugados tienen una proporción de sacárido:proteína (p/p) con un exceso de proteína; y (iii) la composición contiene entre 10 µg y 25 µg de sacáridos capsulares de meningococo por dosis, con una cantidad de 2,5 µg, 5 µg o 10 µg de cada sacárido.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que los sacáridos A, C, W135 e Y están presentes a 5 µg cada uno por dosis o a 2,5 µg cada uno por dosis.
- 10 3. La composición de la reivindicación 2, en la que los sacáridos A, C, W135 e Y están presentes a 5 µg cada uno por dosis.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que los sacáridos están presentes en una proporción A:C:W135:Y (p/p) de 1:1:1:2, 4:2:1:1, 4: 2:1:2, 4:2:2:1, 2:2:1:1, 2:2:1:2 ó 2:2:2:1.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los sacáridos tienen la misma proteína portadora.
- 15 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la proteína portadora es un toxoide tetánico.
7. Una composición inmunógena inyectable que comprende sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y de *Neisseria meningitidis*, en la que: (i) dichos sacáridos capsulares están conjugados con una proteína portadora para dar conjugados individuales para cada uno de los cuatro serogrupos, en la que la proteína portadora es un toxoide tetánico; (ii) los conjugados tienen una proporción de sacárido:proteína (p/p) con un exceso de proteína; y (iii) la composición contiene entre 10 µg y 25 µg de sacáridos capsulares de meningococo por dosis.
- 20 8. La composición de la reivindicación 7, en la que los sacáridos están presentes en una proporción A:C:W135:Y (p/p) de 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2: 1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; ó 2:2:2:1.
9. La composición de la reivindicación 7 o de la reivindicación 8, con una masa sustancialmente igual de cada sacárido.
- 25 10. La composición de la reivindicación 9, en la que la cantidad de cada antígeno de sacárido de meningococo es de aproximadamente 2,5 µg, o de aproximadamente 5 µg (expresada como sacárido) por dosis.
11. La composición de la reivindicación 10, que comprende 5 µg de sacárido del serogrupo A, 5 µg de sacárido del serogrupo C, 5 µg de sacárido del serogrupo W135 y 5 µg de sacárido del serogrupo Y.
- 30 12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que cada uno de los cuatro conjugados tienen una proporción de sacárido:proteína (p/p) de hasta 1:2,5
13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los sacáridos capsulares están conjugados con proteínas portadoras a través de un grupo conector.
- 35 14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición tiene un volumen de 0,5 ml.
15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el antígeno que protege frente al serogrupo A de *N. meningitidis* es un sacárido capsular modificado del serogrupo A en el que uno o más grupos hidroxilo han sido reemplazados por grupos bloqueantes.
- 40 16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un antígeno de uno o más de: (a) serogrupo B de *N. meningitidis*; (b) *Haemophilus influenzae* de tipo B; y/o (c) *Streptococcus pneumoniae*.
17. La composición de la reivindicación 16, que comprende un antígeno que protege frente a *H. influenzae* de tipo B.
18. La composición de la reivindicación 16 o de la reivindicación 17, que comprende uno o más antígeno(s) que protege(n) frente al serogrupo B de *N. meningitidis*.
- 45 19. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, que comprende uno o más antígeno(s) que protege(n) frente a *S. pneumoniae*.
20. La composición de la reivindicación 19, en la que el uno o más antígenos comprenden un sacárido de *S. pneumoniae*.
21. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los antígenos de sacáridos de

meningococos de la composición son oligosacáridos conjugados con proteínas portadoras.

22. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un coadyuvante de sal de aluminio.

5 23. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso para desencadenar una respuesta inmunitaria protectora frente a una enfermedad meningocócica en un paciente.

24. La composición de la reivindicación 23, para su uso en un procedimiento para desencadenar una respuesta inmunitaria protectora frente a una enfermedad meningocócica en un paciente humano mediante una inyección intramuscular.