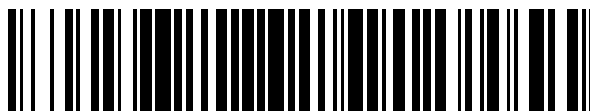


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 291**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07730031 .7**
96 Fecha de presentación: **08.06.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2032161**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.03.2009**

54 Título: **Vacunas LOS L3V**

30 Prioridad:
12.06.2006 US 804475 P
12.06.2006 US 804489 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2012

73 Titular/es:
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
RUE DE L'INSTITUT, 89
1330 RIXENSART, BE

72 Inventor/es:
DEVOS, NATHALIE;
FERON, CHRISTIANE;
POOLMAN, JAN y
WEYNANTS, VINCENT

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 390 291 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 LOS L3V

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de las composiciones de vacunas contra neisseria, a su fabricación y al uso de dichas composiciones en medicina. Más particularmente, se refiere a procedimientos de para fabricar nuevas cepas meningocócicas modificadas mediante ingeniería que sean más adecuadas para la producción de vacunas, en particular de vesícula de membrana externa (o ampolla) de neisseria, en particular, meningocócicas. También se describen procedimientos y productos de vacuna ventajosos basándose en el uso de novedosas vacunas de la subunidad LOS o de vesícula de membrana externa (o ampolla) meningocócica que se han convertido en más seguras y más eficaces para el uso en sujetos humanos.

Antecedentes de la invención

15 *Neisseria meningitidis* (meningococo) es una bacteria gramnegativa aislada frecuentemente del tracto respiratorio superior humano. Es una causa de enfermedades bacterianas invasivas graves, tales como bacteriemia y meningitis. La incidencia de enfermedad meningocócica muestra diferencias geográficas, estacionales y anuales (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (Suplemento), S18-S24, 1989). La bacteria se clasifica habitualmente de acuerdo con el serogrupo de su polisacárido capsular.

20 La mayor parte de la enfermedad en países templados se debe a cepas del serogrupo B y varía en incidencia entre 1-10/100.000/año de la población total, alcanzando en ocasiones valores más altos (Kaczmarek, E. B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55-9, 1995; Scholten, R. J. P. M., Bijlmer, H. A., Poolman, J. T. y col. Clin. Infect. Dis. 16: 237-246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., y col. Epidemiol. Infect. 105: 119-126, 1990).

25 Las epidemias dominadas por meningococos del serogrupo A, en su mayor parte en África central, alcanzan en ocasiones niveles de incidencia de hasta 1.000/100.000/año (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (Suplemento), S18-S24, 1989). Prácticamente todos los casos como una totalidad de la enfermedad meningocócica están provocados por meningococos de los serogrupos A, B, C, W-135 e Y, y existe una vacuna de polisacárido capsular tetravalente A, C, W-135, Y (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M. C., Lafaix, C, J. Biol. Stand. 10: 335-339, 1982).

30 La frecuencia de las infecciones por *Neisseria meningitidis* ha aumentado en las últimas décadas en muchos países europeos. Esto se ha atribuido a un aumento de la transmisión debido a un aumento de las actividades sociales (por ejemplo, piscinas, teatros, etc.). Ya no es infrecuente aislar cepas de *Neisseria meningitidis* que son menos sensibles o resistentes a algunos de los antibióticos convencionales. Este fenómeno ha generado unas necesidades médicas no satisfechas de nuevos agentes antimicrobianos, vacunas, procedimientos de selección de fármacos y pruebas diagnósticas para este organismo.

Las vacunas de polisacáridos disponibles se están mejorando actualmente conjugando químicamente las mismas a proteínas transportadoras (Lieberman, J. M., Chiu, S. S., Wong, V. K., y col. JAMA 275: 1499-1503, 1996).

35 Sin embargo, no se dispone de una vacuna de serogrupo B. Se ha observado que el polisacárido capsular de serogrupo B no es inmunogénico, muy probablemente debido a que comparte similitud estructural con componentes del huésped (Wyle, F. A., Artenstein, M. S., Brandt, M. L y col. J. Infect. Dis. 126: 514-522, 1972; Finne, J. M., Leinonen, M., Mäkelä, P. M. Lancet ii.: 355-357, 1983). Por lo tanto, los esfuerzos se han centrado en intentar desarrollar vacunas de serogrupo B a partir de vesículas de membrana externa (o ampollas) o componentes de proteína purificados de las mismas.

40 Los antígenos meningocócicos alternativos para el desarrollo de vacunas son los lipooligosacáridos (LOS) meningocócicos. Estos son glucolípidos unidos a la membrana externa que difieren de los lipopolisacáridos (LPS) de las Enterobacteriaceae porque carecen de cadenas laterales O y, por tanto, se parecen a la forma general de LPS (Griffiss y col. Rev Infect Dis 1988; 10: S287-295). La heterogeneidad en el resto de oligosacárido de los LOS genera diversidad estructural y antigénica entre diferentes cepas meningocócicas (Griffiss y col. Inf. Immun. 1987; 55: 1792-1800). Esto se ha usado para subdividir las cepas en 12 inmunotipos (Scholtan y col. J Med Microbiol 1994, 41: 236-243). El inmunotipificación se realiza habitualmente por el procedimiento de Ouchterlony usando anticuerpos policlonales adsorbidos generados contra LOS de inmunotipo conocido (Poolman JT, Hopman CTP y Zanen HC, FEMS Microbiol Letters (1982) 13: 339-348).. Los inmunotipos L3, L7 y L9 son inmunológicamente idénticos y son estructuralmente similares (o incluso iguales) y, por lo tanto, se han denominado L3,7,9 (o, para los fines de esta memoria descriptiva, de forma genérica "L3"). Los LOS meningocócicos L3,7,9 (L3), L2 y L5 se pueden modificar por sialilación o mediante la adición de ácido citidina 5'-monofosfato-*N*-acetilneuramínico. Aunque los LOS L2, L4 y L6 se pueden distinguir inmunológicamente, son estructuralmente similares y cuando se menciona en el presente documento L2, dentro del alcance de la invención se puede sustituir opcionalmente con L4 o L6. Se ha demostrado que los anticuerpos para LOS protegen contra infecciones en ratas de experimentación y contribuyen a la actividad bactericida en niños infectados por *N. meningitidis* (Griffiss y col J Infect Dis 1984; 150: 71-79).

Sin embargo, un problema asociado al uso de LOS en una vacuna meningocócica es su toxicidad (debido a su resto de Lípido A).

El LOS también está presente sobre la superficie de ampollas meningocócicas. Durante muchos años, los esfuerzos se han centrado en desarrollar vacunas a base de vesícula de membrana externa (o ampolla) meningocócica (de Moraes, J. C., Perkins, B., Camargo, M. C. y col. Lancet 340: 1074-1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E. A. Gronnesby, J. K. y col. 338: 1093-1096, 1991). Tales vacunas tienen la ventaja de incluir varias proteínas de membrana externa integrales en una conformación plegada apropiadamente que pueden provocar una respuesta inmunológica protectora cuando se administran a un huésped. Además, las cepas de *Neisseria* (incluyendo el serogrupo B de *N. meningitidis* - menB) excretan ampollas de membrana externa en cantidades suficientes para permitir su fabricación en una escala industrial. Sin embargo, con mayor frecuencia se preparan ampollas mediante procedimientos que comprenden una extracción con detergente al 0,5 % (por ejemplo, desoxicolato) de las células bacterianas (por ejemplo, documento EP 11243). Aunque esto se desea debido a la toxicidad de LOS (también denominado endotoxina) como se ha descrito anteriormente, también tiene el efecto de eliminar la mayor parte del antígeno LOS de la vacuna. Un problema adicional con el uso de LOS como un antígeno de vacuna es que existen 12 inmunotipos de LPS con una diversa variedad de estructuras de hidratos de carbono (M. P. Jennings y col, Microbiology 1999, 145, 3013-3021; Mol Microbiol 2002, 43: 931-43). Los anticuerpos generados contra un inmunotipo no consiguen reconocer un inmunotipo diferente. Aunque los esfuerzos se han centrado en producir una región "central" genérica de las porciones de oligosacáridos de los inmunotipos de LOS (por ejemplo, documento WO 94/08021), la actividad bactericida de anticuerpos generados contra el LOS modificado se pierde. Por tanto, puede que una vacuna necesite tener muchos componentes de LOS de inmunotipo diferente para ser eficaz. Existe un problema adicional con el uso de LOS (también conocido como LPS o lipopolisacárido) como antígenos en vacunas humanas, concretamente, que llevan estructuras de sacáridos que son similares a estructuras de sacáridos humanos (por ejemplo, en glóbulos rojos humanos), planteando por tanto un problema de seguridad con su uso. Pero el cambio de la estructura de LOS es problemático debido a la sensibilidad estructural de la eficacia bactericida del antígeno LOS.

El documento WO 2004/014417 describe ciertas soluciones a estos problemas.

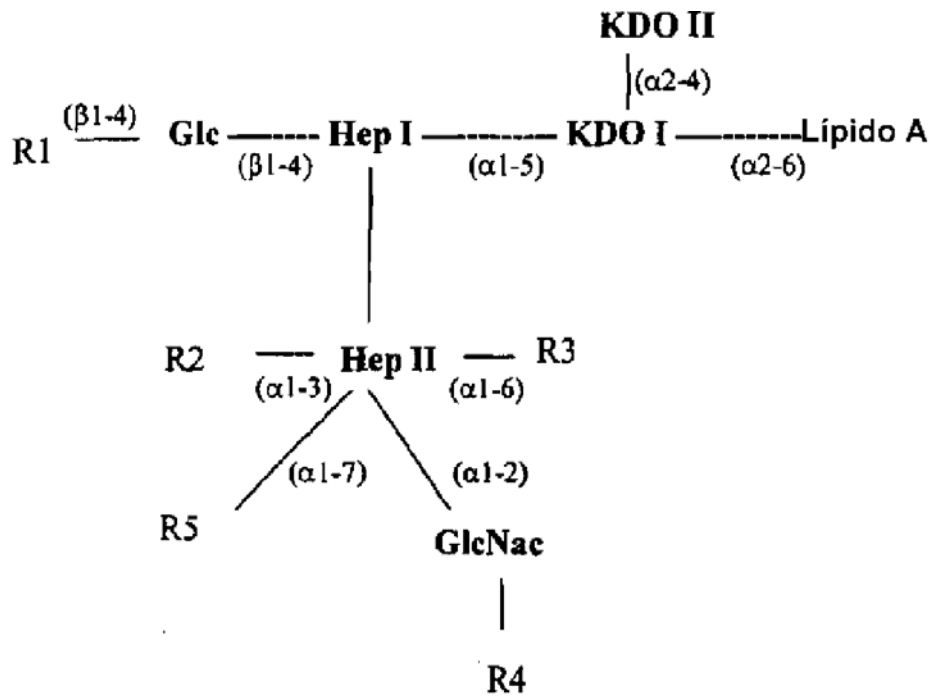
Los presentes inventores han encontrado además que:

- la decoración del núcleo interno de LOS es importante para definir el epítipo bactericida del inmunotipo,
- se ha demostrado que las combinaciones de LOS de estructuras diferentes pueden ser eficaces contra la enfermedad meningocócica de los serogrupos A, B, C, W135 e Y,
- un inmunotipo L3V variante conocido no es destruido por el suero anti-3, sino por el suero anti-L2,
- se ha encontrado la enzima por la que el LOS L2 se somete a la decoración de O-acetilación en el resto GlcNAc unido a Heptosa II y el gen que la codifica Oac1,
- se ha encontrado un LOS de inmunotipo L3 que está O-acetilado (no descrito nunca previamente) y esto parece estar generalizado entre las cepas L3,
- aunque los anticuerpos contra LOS L3 convencionales pueden inactivar cepas L3 O-acetiladas, la inactivación no es tan eficaz como contra cepas L3 convencionales.

Los anteriores hallazgos han conducido a los inventores a sugerir el uso de LOS L3 O-acetilado de un modo nuevo y beneficioso en la fabricación de formulaciones de vacuna de *Neisseria*.

40 **Sumario de la invención**

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona una vacuna que comprende LOS L3V y LOS L3 de cepas de *Neisseria*, en las que LOS tiene la estructura siguiente:



en la que:

- R1 = Hexosa-Hexosa
- R2 = H o PEA,
- R3 = PEA,
- R4 = OAc,
- R5 = H o Gly.

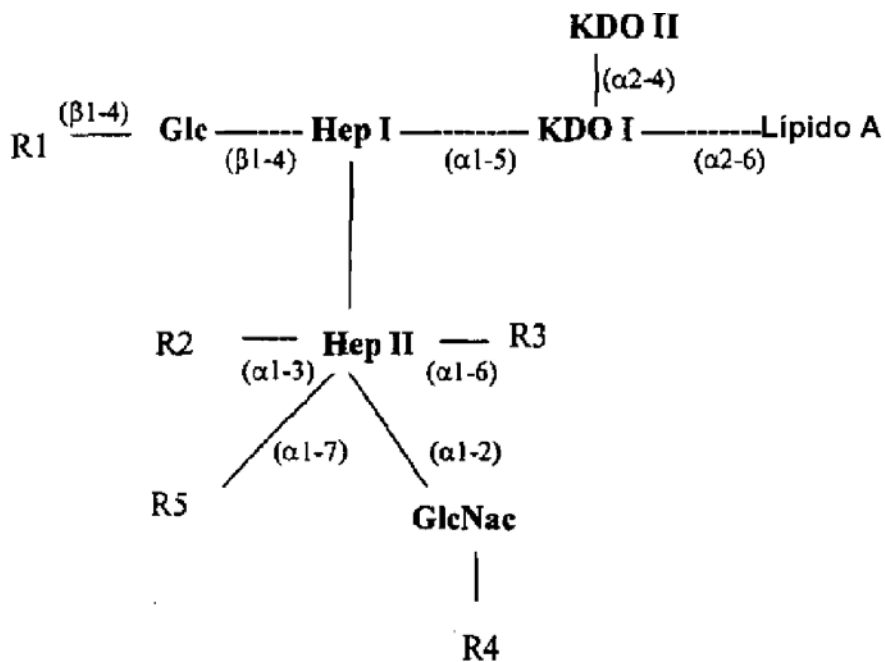
5

"R1 = Hexosa-Hexosa-" puede cubrir restos Gal-Gal-, Gal-Glc-, Glc-Gal- o Glc-Glc-, por ejemplo:

10

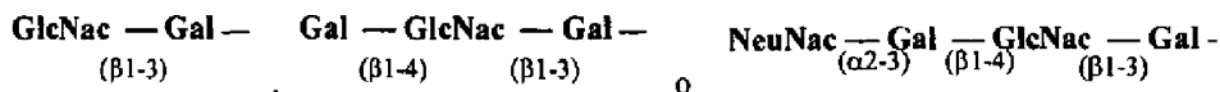
La hexosa terminal de R1 en el LOS L10 de la invención puede o no estar sialilada (si lo está, entonces opcionalmente mediante un grupo α -Neu5Ac-).

Cuando el LOS L3V de la vacuna o composición inmunogénica de la invención tiene R2 = PEA, la composición inmunogénica de la invención puede comprender además LOS L4 de la invención de la siguiente estructura:



en la que para el LOS L4:

R1 =



- 5 R2 = H,
R3 = PEA,
R4 = OAc,
R5 = Gly.

Como alternativa, el LOS L4 de la invención puede tener R4 = H y/o R5 = H.

El LOS L4 de la invención se puede aislar de una cepa de *N. meningitidis* de os serogrupos A, B, C, W135 o Y.

- 10 Con "uno o más de los LOS de la invención" o "LOS de la invención" o expresiones similares en el presente documento se quiere decir LOS L2, LOS L3V, LOS L3 LOS L10, LOS L4, LOS L2 o L3V y L3 , LOS L2 o L3V y L10, LOS L3 y L10, LOS L4 y L2 o L3V, LOS L4 y L3, LOS L4 y L10, LOS L2 o L3V y L3 y L10, LOS L2 o L3V y L3 y L4, LOS L2 o L3V y L4 y L10, LOS L3 y L4 y L10 o LOS L2 o L3V y L3 y L10 y L4 de la invención. Con "preparaciones de ampolla de la invención" o expresiones similares en el presente documento se quiere decir una o más ampollas de la invención que tienen LOS L2, LOS L3V, LOS L3, LOS L10, LOS L4, LOS L2 o L3V y L3, LOS L2 o L3V y L10, LOS L3 y L10, LOS L4 y L2 o L3V, LOS L4 y L3, LOS L4 y L10, LOS L2 o L3V y L3 y L10, LOS L2 o L3V y L3 y L4, LOS L2 o L3V y L4 y L10, LOS L3 y L4 y L10 o LOS L2 o L3V y L3 y L10 y L4 de la invención. Las cepas bacterianas de la invención son aquellas de las que se puede aislar uno o más de los LOS de la invención.

- 20 Uno o más de los LOS de la invención se pueden conjugar con un vehículo de proteína (una fuente de epítomos de células T colaboradoras, tales como el toxoide tetánico, el toxoide de difteria, CRM 197 o una proteína de membrana externa en una ampolla meningocócica (véase más adelante). Uno o más puede tener su resto de Lípido A destoxificado químicamente (véase más adelante) o genéticamente (por ejemplo, si se aísla de una cepa de neisseria que es msbB(-) y/o htrB(-), véase más adelante).

- 25 Puede estar presente uno o más LOS de la invención en la composición inmunogénica o vacuna como una preparación de LOS purificada, como una preparación liposómica (que comprende normalmente LOS purificado) o como una preparación de ampolla (véase más adelante).

- 30 La preparación o las preparaciones de ampolla de la invención se pueden aislar de sus respectivas cepas de neisseria después de una etapa de extracción usando detergente, preferentemente desoxicolato, al 0-0,5, 0,02-0,4, 0,04-0,3, 0,06-0,2, 0,08-0,15 ó 0,09-0,11 %. Sus respectivas cepas de neisseria se pueden haber cultivado en condiciones con hierro disponible para las mismas o en condiciones de agotamiento de hierro (por ejemplo, con un quelante del hierro añadido tal como desferal, véase más adelante). Las preparaciones de ampolla de la invención se pueden aislar de una cepa de neisseria que no puede sintetizar polisacárido capsular. Por ejemplo, la cepa puede tener uno de los siguientes genes de polisacárido capsular de expresión regulada por disminución o delecionados (es decir, sin expresión funcional del gen) en comparación con la cepa nativa de la que procede: ctrA, ctrB, ctrC, ctrD, synA, synB, synC, o, preferentemente, siaD. Cuando están presentes ampollas L2 o L3V y L3 (o está presente más de una preparación de ampolla de la invención), las cepas de las que se obtienen pueden tener el mismo gen de polisacárido capsular de expresión regulada por disminución en cada cepa. La cepa de neisseria puede tener cualquiera o ambos de los siguientes genes de lípido A de expresión regulada por disminución y, preferentemente, delecionados (es decir, sin expresión funcional del gen) en comparación con la cepa nativa de la que se obtiene: msbB o htrB, preferentemente la primera. Cuando están presentes ampollas L2 o L3V y L3 (o está presente más de una preparación de ampolla de la invención), las cepas de las que se obtienen las ampollas tienen, preferentemente, el mismo gen(es) de lípido A de expresión regulada por disminución en cada cepa. La cepa de neisseria puede tener 1 o más de los siguientes genes de proteína de membrana externa de expresión regulada por disminución y, preferentemente, delecionados (es decir, sin expresión del producto génico en la membrana externa de la cepa) en comparación con la cepa nativa de la que se obtiene: porA, porB, opA, opC, pilC, lbpA o frpB. Cuando están presentes ampollas L2 o L3V y L3 (o está presente más de una preparación de ampolla de la invención), las cepas tienen preferentemente el mismo gen o genes de proteína de membrana externa de expresión regulada por disminución en cada cepa de neisseria. La cepa de neisseria puede tener 1 o más de los siguientes antígenos de proteína de membrana externa de expresión regulada por aumento: NspA, TbpA low, TbpA high, Hsf, Hap, OMP85, PilQ, NadA, GNA1870, MltA. Cuando están presentes ampollas L2 o L3V y L3 (o está presente más de una preparación de ampolla de la invención), las cepas de las que se obtienen tienen, preferentemente, uno o más antígenos de la proteína de la membrana externa de expresión regulada por aumento en cada cepa.

- 55 Se proporcionan además composiciones de vacuna que comprenden una cantidad eficaz de la composición inmunogénica de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La vacuna puede comprender adicionalmente un adyuvante, por ejemplo, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio. La vacuna puede comprender adicionalmente uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares conjugados obtenidos de las

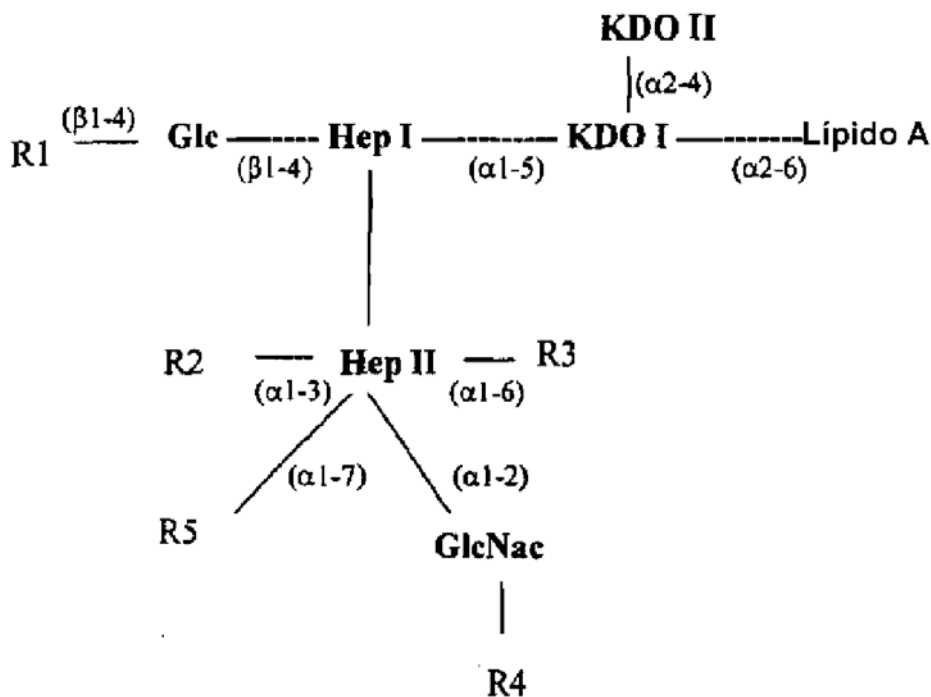
siguientes cepas: Serogrupo A de meningococo, serogrupo C de meningococo, serogrupo W-135 de meningococo, serogrupo Y de meningococo y *H. influenzae* de tipo b.

5 También se proporciona un uso de la composición inmunogénica de la invención o la vacuna de la invención en la fabricación del medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedad provocada por uno o más serogrupos de *N. meningitidis* seleccionados entre la siguiente lista: A, B, C, W135, e Y. Se proporciona además un procedimiento para la prevención o el tratamiento de enfermedad provocada por uno o más serogrupos de *N. meningitidis* seleccionados entre la siguiente lista: A, B, C, W135 e Y, que comprende la etapa de administrar la composición inmunogénica de la invención o la vacuna de la invención a un paciente humano que lo necesite.

10 Se proporciona además un procedimiento para fabricar las vacunas de la invención, que comprende la etapa de aislar el LOS L3V y el LOS L3, combinar los LOS L3V y L3 y formular el LOS L3v y l3 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

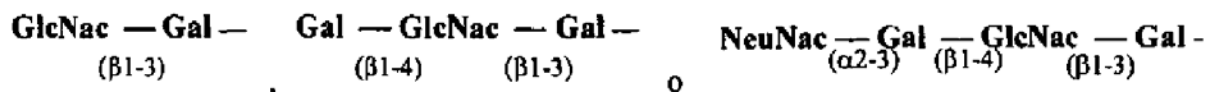
Los inventores también han encontrado que las cepas del inmutotipo L3V son sorprendentemente susceptibles a la destrucción por sueros generados contra LOS del inmutotipo L2. Para los fines de la presente invención, el inmutotipo L3V no está clasificado como una cepa L3, ya que es inmunológicamente más similar al inmutotipo L2.

15 De acuerdo con esto, en un aspecto adicional de la invención se proporciona un uso de una composición inmunogénica que comprende LOS L3V de una cepa de Neisseria en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedad por inmutotipo L2 de *N. meningitidis* o de una composición inmunogénica que comprende LOS L2 de una cepa de Neisseria en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedad por inmutotipo L3V, en el que el LOS L3V tiene la estructura siguiente:



20 en la que:

R1=



25 R2 = PEA,
R3 = PEA,
R4 = H o OAc,
R5 = H, PEA o Gly.

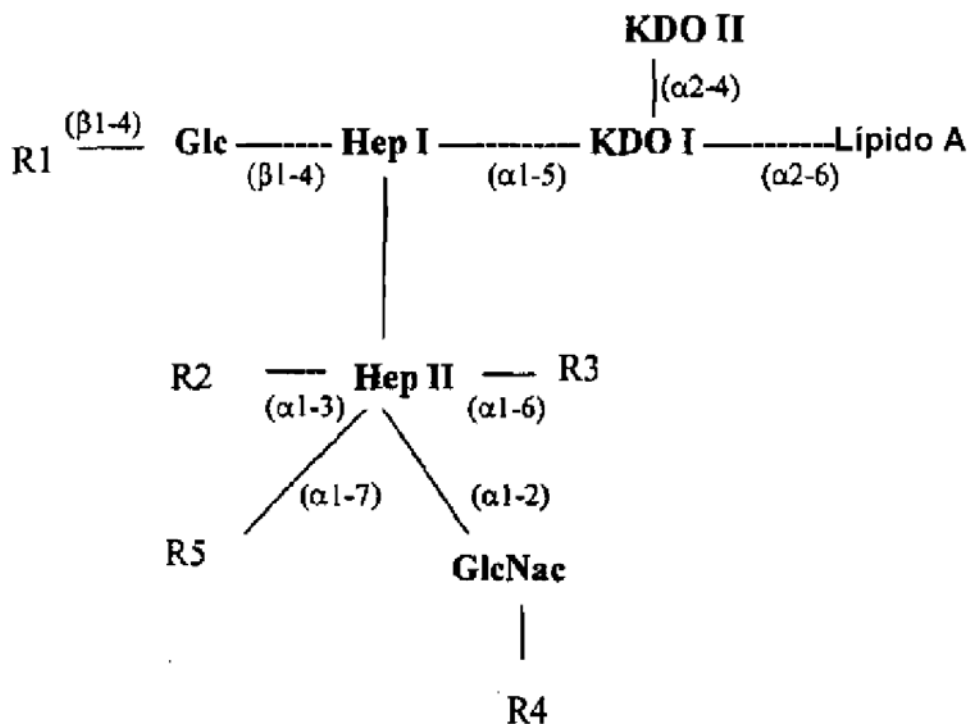
También se proporciona un procedimiento para prevenir o tratar una enfermedad por inmutotipo L3 de *N.*

meningitidis que comprende la etapa de administrar a un paciente humano que lo necesite una cantidad eficaz de una composición inmunogénica que comprende LOS L3V de una cepa de *Neisseria*, o para prevenir o tratar una enfermedad por inmutotipo L3V de *N. meningitidis* que comprende la etapa de administrar a un paciente humano que lo necesite una cantidad eficaz de una composición inmunogénica que comprende LOS L2 de una cepa de *Neisseria*.

5

La anterior puede también ser la estructura del LOS transportado por la enfermedad causada por el inmutotipo L3V de *N. meningitidis* al que se ha hecho referencia anteriormente para este aspecto de la invención.

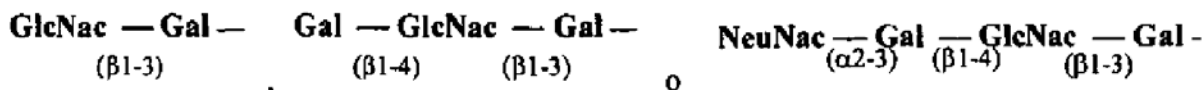
En el procedimiento/uso anterior de este aspecto de la invención, el LOS L2 puede tener la estructura siguiente:



10

en la que:

R1=



15

R2= Glc,
 R3 = PEA,
 R4 = H o OAc,
 R5 = H, PEA o Gly,

20

La anterior puede también ser la estructura del LOS transportado por la enfermedad causada por el inmutotipo L2 de *N. meningitidis* al que se ha hecho referencia anteriormente para este aspecto de la invención.

25

Como se explica a lo largo de esta memoria descriptiva para LOS de la presente invención, el LOS L2 o L3V de este aspecto de la invención se puede conjugar con un vehículo de proteína (véase anteriormente y más adelante para una explicación adicional), puede comprender un resto de lípido A destoxificado, por ejemplo, que carece de una cadena secundaria de acilo coherente con el LOS que se ha aislado de una cepa de *neisseria* msbB(-) (y/o formando complejos LOS con los péptidos de destoxificación de Lípido A que se describen más adelante), puede estar presente en la composición inmunogénica como una preparación de LOS purificado, como una preparación

liposómica o como una preparación de ampolla. Si es una preparación de ampolla, se puede aislar de su respectiva cepa de neisseria después de una etapa de extracción usando detergente, preferentemente desoxicolato, al 0-0,5, 0,02-0,4, 0,04-0,3, 0,06-0,2, 0,08-0,15 ó 0,09-0,11 %. La cepa de neisseria puede no ser capaz de sintetizar polisacárido capsular, por ejemplo, puede tener uno de los siguientes genes de polisacárido capsular de expresión regulada por disminución y, preferentemente, delecionados (sin expresión funcional) en comparación con la cepa nativa de la que se obtiene: *ctrA*, *ctrB*, *ctrC*, *ctrD*, *synA*, *synB*, *synC*, o, preferentemente, *siaD*. La cepa de neisseria puede tener cualquiera o ambos de los siguientes genes de lípido A de expresión regulada por disminución y, preferentemente, delecionados (es decir, sin expresión funcional del gen) en comparación con la cepa nativa de la que se obtiene: *msbB* o *htrB*, preferentemente la primera.

10 Leyendas de las figuras

Figura 1: Los patrones de sustitución comunes de estructuras de LOS meningocócica como se demuestran por estructuras de los inmuno tipos L1-L8 (tomados de Kahler y col. *Glycobiology* 2005 15: 409-419/2006 JBC 281: 19939-19948). La estructura de inmunitipo L7 (no mostrada) es la versión no sialilada de la estructura de inmunitipo L3. La región central interna conservada se muestra con uniones variables indicadas como R1-R5. La composición de la cadena α (R1) está dominada por la expresión de variación de fase de las *IgtA-E* transferasas e *Ist*, que codifica la sialiltransferasa que une el grupo α -Neu5Ac (ácido siálico) terminal. Obsérvese que la unión de glicina a los núcleos internos es mediante la posición 7 en el segundo resto Hep. Obsérvese que no se muestra un resto KDO adicional que se sabe que está presente en el núcleo interno para todos los inmunitipos unidos al resto KDO mostrado en el diagrama.

Figura 2A: Esquema de las estructuras LOS de diversas cepas L3 de *N. meningitidis* como se determinan por espectrometría de masas. De forma interesante, algunas cepas L3 menos propensas a inactivarse por sueros obtenidos de H44/76 están O-acetiladas.

Figura 2B: Estructuras de LOS comunes de diversos inmunitipos de *N. meningitidis*. Se proporcionan los nombres de genes conocidos que codifican enzimas para formar ciertas partes de la estructura de LOS.

Figura 3A: Gen de O-acetilación de LOS de *N. meningitidis* NMA 2202 de la cepa Z2491. Obsérvese que la secuencia de 5 G en el marco de lectura abierto (caso superior) hace que el marco de lectura abierto esté en marco. 3B: Gen de O-acetilación de LOS de *N. meningitidis* NMB 0285 de la cepa MC58. Marco de lectura abierto en el caso superior, las secuencias circundantes (por ejemplo, la secuencia del promotor) en el caso inferior. Obsérvese que la secuencia de 6 G en el marco de lectura abierto (subrayado) hace que el marco de lectura abierto esté fuera del marco. 3C: Gen de O-acetilación de LOS de *N. meningitidis* (equivalente a NMB 0285) de la cepa 760676. El marco de lectura abierto en el caso superior, las secuencias circundantes (por ejemplo, la secuencia del promotor) en el caso inferior. Obsérvese que la secuencia de 5 G en el marco de lectura abierto (subrayado) hace que el marco de lectura abierto esté en marco. 3D: Fen de O-acetilación de LOS de *N. meningitidis* (equivalente a NMB 0285) de (MenB, L3) cepa NZ124. Marco de lectura abierto en el caso superior, las secuencias circundantes (por ejemplo, la secuencia del promotor) en el caso inferior. Obsérvese que la secuencia de 5 G en el marco de lectura abierto (subrayado) hace que el marco de lectura abierto esté en marco.

Figura 4: A- Oligosacárido central interno de LOS 6275 (ES-); B - oligosacárido central interno de LOS 6275 (EM/EM ES+ m/z 1803,6), esquema mostrado de la estructura que muestra HepII unida a PEA en las posiciones 3 y 6 y estando el núcleo interno O-acetilado; C - oligosacárido central interno de Men C cepa C11 (ES-).

Figura 5: Impacto de sialilación de LOS L2 sobre la inducción de anticuerpos bactericidas cruzados por vacunas de OMV obtenidas de L2. Títulos de SBA (GMT para inactivación del 50 %) y seroconversión (%).

Figura 6: Análisis estructural de espectrometría de masas de LOS L10 de 3125 de MenA.

Descripción de la invención

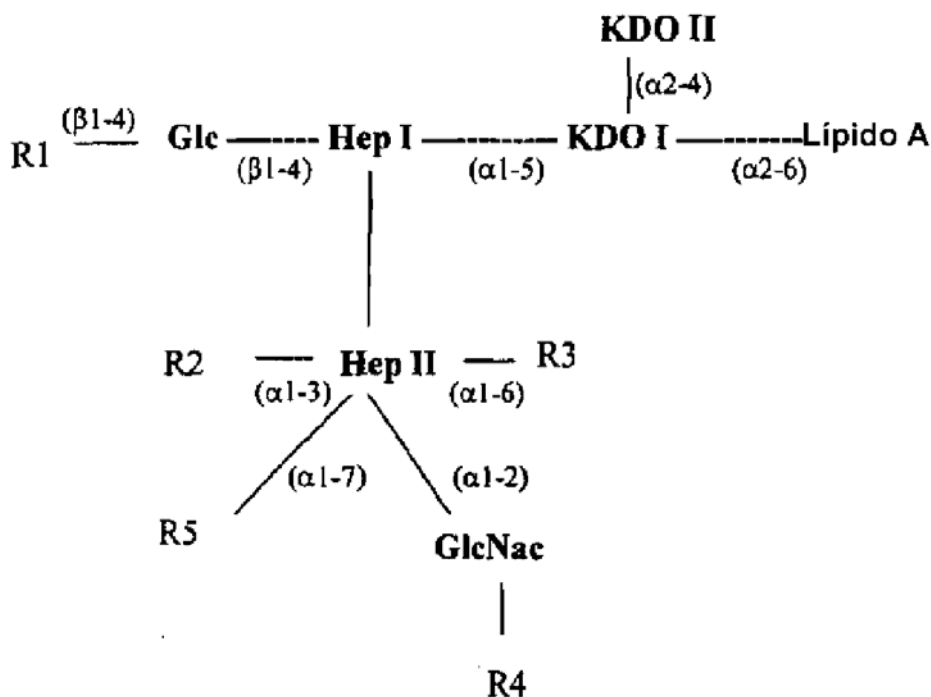
La materia objeto y la información divulgada en las publicaciones y patentes o solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan por referencia en el presente documento.

La referencia a "lipooligosacárido" (o "LOS") también se puede denominar "lipopolisacárido" o "LPS".

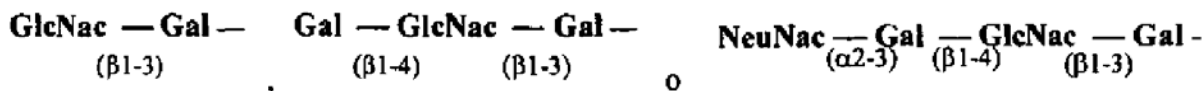
Las expresiones "que comprende", "comprenden" y "comprende" usadas por los inventores en el presente documento tienen por objeto ser opcionalmente sustituibles por las expresiones "que está constituido por", "constituidos por" y "constituido por", respectivamente, en cualquier caso.

Los presentes inventores han encontrado que el acortamiento de las estructuras de oligosacáridos LOS conduce a la pérdida de epítomos que pueden provocar una respuesta inmunitaria bactericida. En lugar de esto, los inventores han observado que para usar más eficazmente los LOS en una formulación de vacuna, la estructura de los oligosacáridos LOS se tiene que conservar tanto como sea posible, pero una combinación de solamente 2 (o 3 o 4) antígenos LOS puede producir una vacuna de Neisseria (preferentemente meningocócica) universalmente eficaz.

Un primer aspecto de la invención es una vacuna que comprende LOS L3V y LOS L3 de cepas de Neisseria, en las que los L2 L3V y L3 tiene la estructura siguiente:



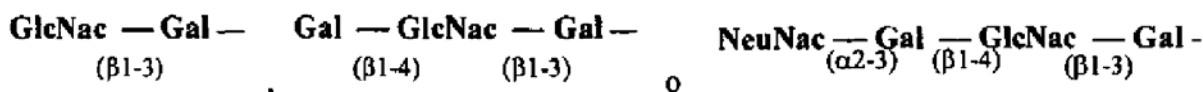
en la que para el LOS L3V: R1=



5

- R2 = PEA,
- R3 = PEA,
- R4 = H o OAc,
- RS = H, PEA o Gly,

10 en la que para el LOS L3: R1=



15

- R2 = PEA,
- R3 = H,
- R4 = H o OAc,
- R5 = H o Gly

que además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Dichas vacunas son útiles para la prevención o el tratamiento de enfermedad producida por Neisseria (preferentemente meningocócica o meningocócica B) y pueden comprender además LOS L10 y/o L4 de la invención. Los LOS se pueden aislar mediante cualquier procedimiento conocido de purificación o pueden estar presentes en al menos dos preparaciones de vesícula de membrana externa (o ampolla) obtenidas, por ejemplo, de cepas de Neisseria L3V y L3. Para eliminar los LOS sujetos sueltos tóxicos de la preparación de ampolla, pero conservar altos niveles de antígeno LOS integrado en la ampolla, se prefiere que las ampollas se extraigan usando una baja concentración de detergente, preferentemente desoxicolato (o DOC) al 0,0,3 %, preferentemente al 0,05-0,2 %, más preferentemente aproximadamente al 0,1 %. Tal combinación de antígenos LOS, particularmente en una vacuna de ampolla, es sorprendentemente ventajosa por ser eficaz contra más del 90 % de las cepas de *N. meningitidis*.

25

Los inventores también han encontrado que las anteriores vacunas de ampolla de la invención y, de hecho, cualquier composición inmunogénica de ampolla obtenida de *Neisseria* (preferentemente gonocócica o meningocócica) puede tener un efecto mejorado de antígenos protectores (incluyendo LOS) sobre su superficie si ciertas combinaciones de proteínas de membrana externa inmunodominantes tienen la expresión regulada por disminución (y preferentemente delecionada). Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención es una o más preparaciones de ampolla de *Neisseria* de la invención que se obtiene de una cepa de *Neisseria* que tiene 2 o más de las siguientes proteínas de membrana externa de expresión regulada por disminución y, preferentemente, delecionadas, en comparación con la cepa nativa no modificada: PorA, PorB, OpA, OpC o PilC. Preferentemente PorA y OpA, PorA y OpC, OpA y OpC, o PorA & OpA y OpC están reguladas por disminución o delecionadas. La regulación por disminución (preferentemente deleción) de la expresión de FrpB también se ha demostrado que es beneficiosa al mejorar el efecto de antígenos con protección cruzada, particularmente en preparaciones de ampolla realizadas a partir de cepas de *Neisseria* cultivadas en condiciones de limitación de hierro. Una ampolla de *Neisseria* de la invención obtenida de una cepa con esta mutación es, por tanto, una realización adicional de la invención, al igual que ampollas obtenidas de una combinación de regulación por disminución de FrpB con una o más de las regulaciones por disminución que se han mencionado anteriormente. Se prefiere que si está regulada por disminución PorA, PorB no debe estar regulada por disminución y viceversa.

Las anteriores mutaciones son beneficiosas en cualquier cepa de *Neisseria* (preferentemente meningocócica, más preferentemente menB) de la que se tienen que obtener las composiciones inmunogénicas o vacunas de ampolla de la invención, particularmente las que se describen en el presente documento, sin embargo, se prefiere que se usen cepas de *Neisseria* (preferentemente meningocócicas, más preferentemente menB) de inmunotipo L2, L3V o L3, normalmente extraídas con un procedimiento de extracción con bajo % de DOC como se describe en el presente documento. Preferentemente, las composiciones inmunogénicas o vacunas de ampolla de la invención contienen ampollas tanto L2 como L3V como L3 donde al menos una (y preferentemente ambas) es deficiente en las anteriores combinaciones de proteínas de membrana externa (u OMP) inmunodominantes. En el documento WO 01/09350 (incorporado por referencia en el presente documento) se analizan técnicas para regular por disminución estos genes. Se conoce que existen cuatro genes de Opa diferentes en el genoma meningocócico (Aho y col. 1991 Mol. Microbiol. 5: 1429-37), por lo tanto, cuando se dice que Opa tiene la expresión regulada por disminución, se quiere decir que preferentemente 1, 2, 3 o (preferentemente) los 4 genes presentes en meningococo están regulados por disminución de este modo. Tal regulación por disminución se puede realizar genéticamente como se describe en el documento WO 01/09350 o buscando cepas meningocócicas que se hallan fácilmente, naturales, estables, que expresan los loci de Opa o lo hacen a un nivel muy bajo. Tales cepas se pueden encontrar usando la técnica descrita en Poolman y col (1985 J. Med. Micro. 19: 203-209), en la que las células que son Opa tienen un fenotipo diferente con respecto a las células que expresan Opa que se pueden observar mirando el aspecto de las células en las placas o bajo un microscopio. Una vez encontrada, se puede demostrar que la cepa es Opa estable realizando una transferencia Western en los contenidos celulares después de un ciclo de fermentación para establecer la ausencia de Opa.

Seguridad de las composiciones inmunogénicas o vacunas de LOS anteriores

La seguridad de los anticuerpos generados para LOS L3 o L2 se ha cuestionado debido a la presencia de una estructura similar al grupo de oligosacárido lacto-*N*-neotetraosa ($\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-$; Fig 1) presente en glucoesfingolípidos humanos. Aunque un gran número de personas se han vacunado de forma segura con vacunas de vesícula extraídas con desoxicolato que contienen una cantidad residual de LOS L3 (G. Bjune y col, Lancet (1991), 338, 1093-1096; GVG. Sierra y col. NIPH ann (1991), 14, 195-210), si se tiene que conservar LOS como un antígeno como se analiza en el presente documento, los presentes inventores han descubierto que la deleción de una parte terminal de la estructura de sacárido LOS es ventajosa para evitar la reacción cruzada de la respuesta inmunitaria anti-LOS con estructuras presentes en la superficie de tejidos humanos.. En una realización preferida, la inactivación del gen *IgtB* da como resultado una estructura de LOS intermedia en la que el resto de galactosa terminal y el ácido siálico están ausentes (véase las Figuras 1 y 2, la mutación deja una estructura de $4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-$ en LOS L2 y L3 y L4). Tales intermedios se podrían obtener en una cepa de LOS L3 y/o L2 (y/o L4). Una versión alternativa y menos preferida (corta) de los LOS se puede obtener desconectando el gen *IgtE*. Otra versión alternativa y menos preferida de los LOS se puede obtener desconectando el gen *IgtA*. Si se selecciona tal mutación *IgtA*, se prefiere desconectar también la expresión de *IgtC* para evitar que se forme el inmunotipo L1 no inmunogénico.

Los mutantes *IgtB*⁻ son más preferidos ya que los inventores han observado que éste es el truncamiento óptimo para resolver el problema de la seguridad mientras que todavía se conserva un epítipo de oligosacárido protector LOS que todavía puede inducir una respuesta de anticuerpo bactericida (e incluso bactericida cruzado).

Por lo tanto, las preparaciones anteriores de L2 o L3V y/o L3 (o uno o más de los LOS de la invención como se han definido anteriormente) (purificadas o en una ampolla aislada) de la invención o preparaciones de ampolla meningocócicas de la invención en general (particularmente L2 o L3V y/o L3) se obtienen ventajosamente de una cepa de *Neisseria* (preferentemente meningocócica) que se ha modificado genéticamente para regular por disminución de forma permanente la expresión del producto génico funcional del gen *IgtB*, *IgtA* o *IgtE*, preferentemente desconectando el gen, más preferentemente delecionando todo o parte del promotor y/o el marco de lectura abierto del gen.

Preferentemente, las cepas de neisseria de la invención son deficientes en la síntesis de polisacárido capsular.

5 Cuando las anteriores preparaciones de ampolla de la invención se obtienen de una cepa de meningococo B, se prefiere particularmente que también se elimine el polisacárido capsular (que también contiene estructuras de
 10 sacárido de tipo humano). Aunque se podrían desconectar muchos genes para conseguir esto, los inventores han demostrado ventajosamente que se prefiere que la cepa de producción de ampolla se haya modificado genéticamente para regular por disminución de forma permanente la expresión del producto génico funcional del gen
 15 *siaD* (es decir, regulando por disminución la actividad de α -2-8 polisialiltransferasa), preferentemente desconectando el gen, más preferentemente delecionando todo o parte del promotor y/o el marco de lectura abierto del gen. Tal inactivación se describe en el documento WO 01/09350. La mutación de *siaD* (también conocida como *synD*) es la
 20 más ventajosa de muchas mutaciones que pueden dar como resultado la eliminación del epítipo similar a humano del polisacárido capsular, debido a que es una de las únicas mutaciones que no tiene efecto sobre la biosíntesis de los epítipos protectores de LOS, siendo, por tanto, ventajosa en un procedimiento que pretende usar finalmente LOS como un antígeno protector y tiene un efecto mínimo sobre el desarrollo de la bacteria. Un aspecto preferido de la invención, por lo tanto, es una preparación inmunogénica de ampolla como se ha descrito anteriormente, que se
 25 obtiene de una cepa mutante de meningococo B *IgtE⁻ siaD*, *IgtA siaD* o, preferentemente, *IgtB⁻ siaD*. La propia cepa es un aspecto adicional de la divulgación.

Aunque es preferible una mutación *siaD* por los motivos anteriores, se pueden usar otras mutaciones que desconectan la síntesis de polisacárido capsular de meningococo B (o meningococo en general). or tanto, la cepa
 20 de producción de ampolla se puede modificar genéticamente para regular por disminución de forma permanente la expresión del producto génico funcional de uno o más de los siguientes genes: *ctrA*, *ctrB*, *ctrC*, *ctrD*, *synA* (equivalente a *synX* y *siaA*), *synB* (equivalente a *siaB*) o *synC* (equivalente a *siaC*), preferentemente desconectando el gen, más preferentemente delecionando todo o parte del promotor y/o el marco de lectura abierto del gen. a
 25 mutación *IgtE⁻* se puede combinar con una o más de estas mutaciones. Preferentemente, la mutación *IgtB⁻* se puede combinar con una o más de estas mutaciones. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención es una preparación inmunogénica o vacuna de ampolla como se ha descrito anteriormente que se obtiene de tal cepa mutante combinada de meningococo B (o meningococo en general). La propia cepa es un aspecto adicional de la divulgación.

En la técnica se conoce un locus de *Neisseria* que contiene diversos genes *Igt*, incluyendo *IgtB* e *IrtE*, y su
 30 secuencia (véase M. P. Jennings y col, *Microbiology* 1999, 145, 3013-3021 y referencias citadas en ese documento; *J. Exp. Med.* 180: 2181 -2190 [1994]; documento WO 96/10086).

35 Cuando se tiene que usar LOS de longitud completa (no truncado) de la invención en el producto final, es deseable que el LOS no esté sialilado (ya que tal LOS puede generar una respuesta inmunitaria contra las cepas de meningococo B más peligrosas, invasivas, que también están sin sialilar). En tal caso, es ventajoso el uso de una cepa negativa a la cápsula que tenga un gen *synA* (equivalente a *synX* y *siaA*), *synB* (equivalente a *siaB*) o *synC* (equivalente a *siaC*) delecionado, ya que tal mutación también convierte los LOS de *menB* en incapaces de ser sialilados. En una realización de la invención, el gen *Ist* (Gilbert y col., *JBC* 1996, 271: 28271-6) se convierte en inactivo funcionalmente (por ejemplo, mediante deleción o alteración o reducción de la expresión del gen) o se
 40 selecciona una cepa para la invención donde el gen está alterado de forma natural (para la familia de inmunotipos L3, tal cepa defectuosa se denomina con frecuencia un inmunotipo L7). *Ist* es una α -2,3-sialiltransferasa que añade el ácido siálico terminal a la cadena alfa de LOS (pero no tiene ningún efecto sobre la producción de ácido siálico). En una realización, la cepa de la invención es *Ist(-)* y *siaD(-)*.

Las mutaciones anteriores son beneficiosas en cualquier cepa de *Neisseria* (preferentemente meningocócica, más preferentemente *menB*) de la que se tienen que obtener las composiciones inmunogénicas o vacunas de ampolla, particularmente las que se describen en el presente documento, sin embargo, se prefiere que se usen cepas de
 45 *Neisseria* (preferentemente meningocócicas, más preferentemente *menB*) de inmunotipo L2 o L3, normalmente extraídas con un procedimiento de extracción con bajo % de DOC como se describe en el presente documento. Preferentemente, las composiciones inmunogénicas o vacunas de ampolla de la invención contienen ampollas tanto L2 como L3V como L3 en las que al menos una (y preferentemente todas) se obtienen de cepas deficientes en la expresión de los anteriores genes.

50 La toxicidad de LOS

Las anteriores composiciones inmunogénicas o vacunas de LOS purificados de la invención también se pueden convertir en menos tóxicas regulando por disminución la expresión de ciertos genes en la cepa de producción bacteriana de la que se obtienen. Aunque tal destoxificación puede no ser necesaria para la inmunización intranasal con OMV nativa (J. J. Drabick y col, *Vaccine* (2000), 18, 160-172), para la vacunación parenteral la destoxificación
 55 presentaría una ventaja. Preferentemente, las composiciones inmunogénicas o vacunas de ampolla de LOS purificado de la invención se destoxifican modificando genéticamente la cepa de producción de *Neisseria* mediante mutación/modificación/inactivación de los genes implicados en la biosíntesis de Lípido A, particularmente los genes implicados en la adición de cadenas secundarias de acilo a lípido A, en particular, regulando por disminución la expresión del producto génico funcional de los genes *msbB* y/o *htrB* y preferentemente desconectando el gen, más preferentemente delecionando todo o parte del promotor y/o el marco de lectura abierto del gen. Alternativamente (o
 60

adicionalmente), las composiciones inmunogénicas o vacunas de ampolla o de LOS purificados se pueden obtener de una cepa de Neisseria que se ha modificado genéticamente de tal forma que uno o más de los siguientes genes están regulados por aumento (introduciendo un promotor fuerte o integrando una copia adicional del gen): pmrA, pmrB, pmrE y pmrF. Alternativamente (o adicionalmente), las composiciones inmunogénicas o vacunas de LOS purificado o ampolla se pueden destoxificar añadiendo equivalentes funcionales de péptido no tóxicos de polimixina B [una molécula con alta afinidad por Lípido A] a las composiciones (véase a continuación, es decir, uno o más de los LOS de la invención forma un complejo con un péptido de unión a lípido A adecuado para reducir la toxicidad de los LOS, tal como SAE2 o SAEPII).

Véase el documento WO 01/09350 para más detalles en relación a los anteriores procedimientos de destoxificación y para secuencias promotoras / génicas pertinentes y procedimientos de regulación por aumento y regulación por disminución. Los genes msbB y htrB de Neisseria también se denominan lpxL1 y lpxL2, respectivamente (véase el documento WO 00/26384) y las mutaciones de delección de estos genes se caracterizan fenotípicamente por el LOS mutante msb⁻ que pierde una cadena secundaria de acilo en comparación con el tipo silvestre (y que conserva 4 cadenas primarias de acilo y 1 secundaria) y el LOS mutante htrB⁻ que pierde ambas cadenas secundarias de acilo. Tales mutaciones se combinan preferentemente con mutaciones para garantizar que la cepa de producción de Neisseria sea deficiente en polisacárido capsular (véase anteriormente) para garantizar la presentación óptima de LOS destoxificado en la ampolla o para ayudar a la purificación de la subunidad de LOS destoxificado.

Véanse los documentos WO 93/14115, WO 95/03327, WO2006/108586, Velucchi y col (1997) J Endotoxin Res 4: 1-12 y el documento EP 976402 para detalles adicionales para equivalentes funcionales de péptidos no tóxicos de polimixina B (péptidos de unión a lípido A adecuados para reducir la toxicidad del LOS de la invención) que se pueden usar en las composiciones de la presente invención, particularmente el uso del péptido SAE2 (de la secuencia KTKCKFLKKC en la que las 2 cisteínas forman un puente disulfuro) y SAEPII (un dímero peptídico descrito en las reivindicaciones 1-10 del documento WO 2006/108586). La referencia a tales péptidos de unión a lípido A en el presente documento se puede referir a cualquiera de las fórmulas específicas o generales de péptidos descritas en las reivindicaciones o ejemplos de las solicitudes de patente que se han citado anteriormente.

Con "regular por disminución la expresión del producto génico funcional" se quiere decir en el presente documento que se realizan adiciones, delecciones o sustituciones en el promotor o el marco de lectura abierto del gen en cuestión de tal forma que se reduce la actividad biosintética del producto génico total (el 60, 70, 80, 90, 95 o más preferentemente el 100 %). Se pueden introducir claramente mutaciones de el marco o se pueden sustituir promotores más débiles, sin embargo, más preferentemente, la mayor parte o toda el marco de lectura abierto y/o el promotor se delecionan para garantizar una regulación por disminución permanente del producto génico (activo) (como se describe en el documento WO 01/09350).

Las mutaciones anteriores son beneficiosas en cualquier cepa de Neisseria (preferentemente meningocócica, más preferentemente menB) de la que se tienen que obtener las composiciones inmunogénicas o vacunas de ampolla, particularmente las que se describen en el presente documento, sin embargo, se prefiere que se usen cepas de Neisseria (preferentemente meningocócicas, más preferentemente menB) de inmunotipo L2 o L3, normalmente extraídas con un procedimiento de extracción con bajo % de DOC como se describe en el presente documento. Preferentemente, las composiciones inmunogénicas o vacunas de ampolla de la invención contienen ampollas tanto L2 como L3V como L3 (o las preparaciones de ampolla de la invención) donde al menos una (y preferentemente ambas) se obtienen de cepas deficientes en la expresión de los anteriores genes.

Otros aspectos de la invención incluyen cepas de Neisseria modificadas genéticamente (preferentemente meningocócicas o gonocócicas o meningocócicas B) de las cuales se pueden obtener preparaciones inmunogénicas o vacunas de LOS o de ampolla de la invención.

Las preparaciones de LOS o de ampolla que contienen LOS de la invención

Un aspecto adicional de la descripción es una preparación de LOS (particularmente cualquiera de las que se han descrito anteriormente) aislada de las cepas de Neisseria de la invención. Preferentemente, el LOS aislado (o ampolla que contiene LOS) es de inmunotipo L2 o L3 y, preferentemente, las composiciones inmunogénicas o vacunas de la invención comprenden preparaciones de LOS tanto L2 como L3V como L3 (o ampollas) de la invención.

Tales preparaciones también se pueden mejorar conjugando la porción de oligosacárido del anterior LOS (purificado o presente en una preparación de ampolla) con un vehículo que comprende una fuente de epítomos de células T (convirtiendo de este modo el LOS en un inmunógeno incluso mejor [dependiente de T]). Una preparación de LOS purificado de la invención se puede convertir alternativamente (o adicionalmente) en un mejor antígeno presentando el mismo en formulaciones de liposoma conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 96/40063 y referencias citadas en ese documento).

El procedimiento de aislamiento de LOS de bacterias se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, el procedimiento de agua caliente-fenol de Wesphal & Jann [Meth. Carbo. Chem. 1965, 5: 83-91]). Véase también Galanos y col. 1969, Eur J Biochem 9: 245-249, y Wu y col. 1987, Anal Bio Chem 160:281-289. También se conocen

técnicas para conjugar LOS aislados (véase, por ejemplo, el documento EP 941738 incorporado por referencia en el presente documento).

Para los fines de la presente invención, "un vehículo que comprende una fuente de epítomos de células T" habitualmente es un péptido o, preferentemente, un polipéptido o proteína. Las técnicas de conjugación se conocen bien en la técnica. Los vehículos típicos incluyen proteína D de *H. influenzae* no ti pable, toxoide tetánico, toxoide de difteria, CRM197 o proteínas de membrana externas presentes en preparaciones de ampolla (particularmente de neisseria o meningocócicas).

Las composiciones de LOS aislados preferidas de la invención son: una composición que comprende LOS aislados L2 o L3V y L3 donde la porción de oligosacárido de cada LOS se conjuga opcionalmente con un vehículo que comprende una fuente de epítomos de células T, una composición que comprende LOS L2 o L3V y L3 que tiene una estructura coherente con haberse obtenido de una cepa meningocócica IgtB⁻, donde la porción de oligosacárido de cada LOS se conjuga opcionalmente con un vehículo que comprende una fuente de epítomos de células T y, más preferentemente, una composición que comprende LOS aislados L2 o L3V y L3 que tienen una estructura coherente con haberse obtenido de una cepa meningocócica IgtB⁻, donde la porción de oligosacárido de cada LOS se conjuga opcionalmente con un vehículo que comprende una fuente de epítomos de células T.

Preferentemente, las composiciones de LOS de la invención (uno o más de los LOS de la invención) se han destoxificado. Esto se puede realizar mediante técnicas conocidas de tratamiento químico con hidracina o hidrólisis alcalina que retiran cadenas de acilo de la molécula (pero que pueden reducir la eficacia protectora de la molécula), pero se realiza preferentemente aislando los LOS de un mutante meningocócico htrB⁻ o msbB⁻ (como se ha descrito anteriormente; particularmente en cepas sin polisacárido capsular) o añadiendo un equivalente funcional de péptido no tóxico de polimixina B [una molécula con alta afinidad por Lípido A] a la composición, en particular, SAEPI 2 o SAEPII (como se ha descrito anteriormente).

Los LOS de la descripción se pueden administrar en un estado aislado (habitualmente en forma de micelas si el resto de lípido A todavía está intacto) o se pueden administrar en un liposoma. En tal caso, se pueden añadir proteínas de membrana externa al liposoma y los LOS se pueden conjugar dentro del liposoma a tales proteínas de membrana externa para convertir el oligosacárido en un antígeno dependiente de T. Esto se puede realizar con una química similar como la descrita para la reticulación de LOS intra-ampolla como se describe más adelante.

Reticulación (conjugación) intra-ampolla de la porción de oligosacáridos de LOS con proteínas de la membrana externa presentes en la superficie de la ampolla

Cuando está presente LOS (particularmente el LOS de la invención) en una formulación de ampolla, el LOS se conjuga preferentemente *in situ* mediante procedimientos que permiten la conjugación de LOS con una o más proteínas de membrana externa también presentes en la preparación de ampolla (por ejemplo, PorA o PorB en meningococo). Por tanto, un aspecto adicional de la invención es una preparación de ampolla (una o más preparaciones de ampolla de la invención) de una cepa bacteriana gramnegativa en cuya membrana externa se integra una proteína de membrana externa conjugada con LOS. Aunque se pueden añadir LOS a una preparación de ampolla para la conjugación, se prefiere que el LOS esté presente de forma natural sobre la superficie de la preparación de ampolla.

Este procedimiento puede mejorar ventajosamente la estabilidad y/o la inmunogenicidad (proporcionando ayuda de células T) y/o la antigenicidad del antígeno LOS dentro de la formulación de ampolla -dando por tanto ayuda de célula T para el inmunógeno de oligosacárido independiente de T en su conformación más protectora- como LOS en su entorno natural sobre la superficie de la membrana externa. Además, la conjugación del LOS dentro de la ampolla puede dar como resultado una destoxificación del LOS (sin desear quedar ligado por la teoría, la porción de lípido A se puede llevar de forma más estable en la membrana externa si se conjuga, estando por tanto menos disponible para provocar toxicidad). Por tanto, los procedimientos de destoxificación que se han mencionado anteriormente de aislar ampollas de mutantes htrB⁻ o msbB⁻ o añadiendo equivalente funcional de péptido no tóxico de polimixina B a la composición, pueden no requerirse (pero se pueden añadir en combinación para seguridad adicional).

Las preparaciones de ampolla conjugadas son normalmente tales, que la toxicidad del LOS en la ampolla es reducida en comparación con las mismas ampollas con la misma cantidad de LOS no conjugado en su totalidad. La toxicidad de LOS se puede determinar fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, usando el ensayo de pirogenicidad de conejo para LOS en la Farmacopea Europea (véase el Ejemplo 7 del documento WO 2004/014417).

Las preparaciones de ampolla conjugadas son ventajosamente de tal manera que el LOS conjugado tiene una conformación adecuada para provocar una respuesta inmune en un huésped, cuyos sueros son reactivos (pueden unirse) con LOS no conjugado -presente preferentemente en la bacteria a partir de la cual se preparó la preparación de ampolla y más preferentemente de un modo bactericida en un ensayo de SBA.

Cuando se conjugan ampollas de neisseria con LOS y las ampollas se obtienen de una cepa regulada por disminución en una o más proteínas de membrana externa inmunodominantes como se describe en el presente

documento, se prefiere que si PorA está regulado por disminución, PorB no debe estar regulado por disminución y viceversa. Esto permite que la mayoría de los LOS reticulen con una proteína de membrana externa principal y, por lo tanto, minimiza cualquier efecto de conjugación sobre antígenos de membrana externa menores con protección cruzada presentes en la ampolla.

- 5 En particular, los inventores han observado que una composición que comprende ampollas en las que los LOS presentes en las ampollas se han conjugado de un modo intra-ampolla con proteínas de membrana externa también presentes en la ampolla pueden formar la base de una vacuna para el tratamiento o la prevención de enfermedades provocadas por el organismo del cual se han obtenido las ampollas, donde tal vacuna es de toxicidad reducida (preferentemente sustancialmente no tóxica) y/o es capaz de inducir una respuesta bactericida dependiente de T
10 contra LOS en su entorno nativo.

Por lo tanto, la presente invención proporciona además tal preparación de ampolla conjugada con LOS intra-ampolla. Con "intra-ampolla" que quiere decir que el LOS presente de forma natural en la ampolla se conjuga con la proteína de membrana externa presente en la misma ampolla.

- 15 Tales preparaciones de ampolla se pueden aislar de la bacteria en cuestión (véase el documento WO 01/09350) y después someter a química de conjugación conocida para unir grupos (por ejemplo, NH₂ o COOH) en la porción de oligosacárido de LOS a grupos (por ejemplo, NH₂ o COOH) en proteínas de membrana externa de ampolla. Se pueden usar técnicas de reticulación usando glutaraldehído, formaldehído o mezclas de glutaraldehído/formaldehído, pero se prefiere que se usen químicas más selectivas tales como EDAC o EDAC/NHS (J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220-222 (1986); and Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp173-176). Se describen otras químicas de conjugación o tratamientos capaces de crear enlaces covalentes entre LOS y moléculas de proteína que se podrían usar en la presente invención en el documento EP 941738.

- 25 Preferentemente, las preparaciones de ampolla se conjugan en ausencia de polisacárido capsular. Las ampollas se pueden aislar de una cepa que no produce polisacárido capsular (de forma natural o por mutación) o se pueden purificar de la mayoría (más del 60, 70, 80, 90 o el 99 % eliminado) y preferentemente todos los polisacáridos capsulares contaminantes. De este modo, la reacción de conjugación de LOS intra-ampolla es mucho más eficaz.

Preferentemente, más del 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o del 95 % de los LOS presentes en las ampollas están reticulados/conjugados.

- 30 Preferentemente, las ampollas se han preparado de tal forma que el contenido de LOS de las ampollas es del 3-30, 5-25, 10-25, 15-22 y más preferentemente aproximada o exactamente del 20 % del contenido de LOS como se mide por tinción con plata después de electroforesis en SDS-PAGE usando LOS purificado como un patrón (véase el procedimiento de Tsai, J. Biol. Standardization (1986) 14: 25-33). Se puede conseguir el 20 % de LOS en ampollas meningocócicas con una extracción con DOC bajo al 0,1 %, que puede eliminar moléculas de LOS sujetas de forma
35 suelta pero conservar la mayoría del antígeno.

- Cuando las ampollas conjugadas intra-ampolla se obtienen de meningococo, se prefiere que la cepa de la que se obtienen sea una cepa mutante que no puede producir polisacárido capsular (por ejemplo, una de las cepas mutantes que se han descrito anteriormente, en particular, said'). También se prefiere que las composiciones inmunogénicas o vacunas eficaces contra enfermedad meningocócica comprendan una ampolla tanto L2 o L3V como L3, donde el LOS tanto L2 L3V como L3 se conjuga con proteínas de membrana externa de la ampolla. Además, se prefiere que la estructura de LOS dentro de la ampolla conjugada intra-ampolla sea coherente con haberse obtenido de una cepa meningocócica IgtB⁻. Más preferentemente, las composiciones inmunogénicas comprenden ampollas conjugadas intra-ampolla: obtenidas de una cepa meningocócica mutante L2, L3V o L3 que no puede producir polisacárido capsular y es IgtB⁻; que comprende ampollas L2, L3V o L3 obtenidas de cepas meningocócicas mutantes que no pueden producir polisacárido capsular; que comprenden ampollas L2, L3V o L3 obtenidas de cepas meningocócicas mutantes que son IgtB⁻; o más preferentemente, que comprenden ampollas L2, L3V o L3 obtenidas de cepas meningocócicas mutantes que no pueden producir polisacárido capsular y son IgtB⁻.

- Una cepa meningocócica L3 típica que se puede usar para la presente invención es la cepa menB H44/76. Una cepa L2 típica es la cepa menB B16B6 o la cepa de meningococo tipo C 39E o la cepa 760676. Una cepa L10 típica es la cepa menA 3125. Una cepa L4 es la cepa MenC C 19.

- Como se ha indicado anteriormente, las ampollas se han destoxificado hasta un grado por el acto de la conjugación y no se tienen que destoxificar adicionalmente, sin embargo, se pueden usar procedimientos adicionales de destoxificación para seguridad adicional, por ejemplo, usando ampollas obtenidas de una cepa meningocócica que es htrB⁻ o msbB⁻ o añadiendo un equivalente funcional de péptido no tóxico de polimixina B [una molécula con alta afinidad por Lípido A] (preferentemente SEAP 2 o SEAP II) a la composición de ampolla (como se ha descrito anteriormente). La conjugación de LOS (particularmente de un modo intra-ampolla), por tanto, muestra sorprendentemente una menor toxicidad de LOS en comparación con preparaciones que comprenden la misma cantidad de LOS no conjugado. Por tanto, un procedimiento general para destoxificar ampollas (particularmente
55

meningocócicas) se proporciona adicionalmente mediante la conjugación intra-ampolla de LOS con proteína de membrana externa de ampolla y también se proporciona un procedimiento para destoxificar LOS mediante la conjugación del LOS a la proteína de membrana externa de ampolla.

5 De la anterior manera, se proporcionan ampollas meningocócicas y composiciones inmunogénicas o vacunas que comprenden ampollas que tienen un LOS de antígeno importante que tiene toxicidad reducida (y preferentemente es sustancialmente no tóxico), está desprovisto de problemas de autoinmunidad, tiene un carácter dependiente de células T, está presente en su entorno natural y es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos bactericidas contra potencialmente más del 90 % de las cepas meningocócicas (en el caso de composiciones L2 o L3V +L3).

10 Uno o más de polisacáridos u oligosacáridos capsulares Men A, C, Y o W (preferentemente al menos MenC o MenA y MenC o Men C y MenY) también se pueden conjugar en una proteína de membrana externa de la ampolla de la invención. Aunque esto se podría realizar en la misma reacción que la reticulación de LOS, se prefiere que esto se realice en una reacción separada (preferentemente posterior).

15 El procedimiento de la conjugación de LOS intra-ampolla óptima es un aspecto adicional de la presente invención. Dicho procedimiento debe incorporar las etapas de aislar ampollas de una bacteria gramnegativa (preferentemente usando un bajo % de DOC como se describe en el presente documento), realizando la química adecuada para conjugar LOS (preferentemente por su resto de oligosacárido) presente en las ampollas con una proteína de membrana externa presente en la misma ampolla, aislar la preparación de ampolla conjugada intra-ampolla y, opcionalmente, formular la preparación de ampolla conjugada intra-ampolla con una preparación de ampolla
20 conjugada intra-ampolla adicional preparada mediante el mismo procedimiento pero que tiene un inmunotipo diferente de LOS (preferentemente mezclando ampollas de Neisseria/meningocócicas L2 y L3) y/o formulando la preparación de ampolla con un excipiente farmacéuticamente aceptable para preparar una composición de vacuna.

25 La conjugación intra-ampolla debe incorporar preferentemente 1, 2 o las 3 siguientes etapas del procedimiento: El pH de conjugación debe ser mayor de pH 7,0, preferentemente mayor de o igual a pH 7,5 (más preferentemente inferior a pH 9); las condiciones de sacarosa al 1-5 %, preferentemente al 2-4 %, más preferentemente aproximadamente al 3 % se deben mantener durante la reacción; el NaCl se debe minimizar en la reacción de conjugación, preferentemente por debajo de 0,1 M, 0,15 M, 0,01 M, 0,005 M, 0,001 M y más preferentemente, no estar presente en absoluto. Todas estas características del procedimiento garantizan que las ampollas permanezcan estables y en solución a lo largo del procedimiento de conjugación.

30 El procedimiento de conjugación con EDAC/NHS es un procedimiento preferido para la conjugación intra-ampolla. Se prefiere EDAC/NHS frente a formaldehído que puede reticular en un grado demasiado elevado afectando por tanto de forma adversa a la capacidad de filtración. La EDAC reacciona con ácidos carboxílicos (tales como KDO en LOS) para crear un intermedio de éster activo. En presencia de un nucleófilo amina (tal como lisinas en proteínas de membrana externa tales como PorB), se forma un enlace amida con liberación de un subproducto de isourea. Sin embargo, la eficacia de una reacción mediada por EDAC se puede aumentar mediante la formación de un
35 intermedio de éster de Sulfo-NHS. El éster de Sulfo-NHS sobrevive en solución acuosa más tiempo que el éster activo formado por la reacción de EDAC en solitario con un carboxilato. Por tanto, se pueden obtener rendimientos mayores de formación de enlace amida usando este procedimiento de dos etapas. La conjugación con EDAC/NHS se analiza en J. V. Staros, R. W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220-222 (1986); and Bioconjugates Techniques.
40 Greg T. Hermanson (1996) pp173-176. Preferentemente, se usa 0,01-5 mg de EDAC /mg de ampolla en la reacción, más preferentemente, 0,05-1 mg de EDAC/mg de ampolla. La cantidad de EDAC usada depende de la cantidad de LOS presente en la muestra que, a su vez, depende del % de desoxicolato (DOC) usado para extraer las ampollas. Con un bajo porcentaje de DOC (por ejemplo, del 0,1 %), se usan grandes cantidades de EDAC (1 mg/mg y más allá), sin embargo, con un mayor % de DOC (por ejemplo, del 0,5 %), se usan menores cantidades de EDAC (0,025-
45 0,1 mg/mg) para evitar demasiada reticulación inter-ampolla.

50 Un procedimiento preferido de la invención, por lo tanto, es un procedimiento para producir LOS (preferentemente meningocócico) conjugado intra-ampolla que comprende las etapas de conjugar ampollas en presencia de EDAC/NHS a un pH entre pH 7,0 y pH 9,0 (preferentemente aproximadamente pH 7,5), en sacarosa al 1-5 % (preferentemente aproximadamente al 3 %) y, opcionalmente, en condiciones sustancialmente desprovistas de NaCl (como se ha descrito anteriormente) y aislar las ampollas conjugadas de la mezcla de reacción.

La reacción se puede seguir en geles de separación de Western de la mezcla de reacción usando mAb anti-LOS (por ejemplo, anti-L2 o anti-L3) para mostrar el aumento del peso molecular de LOS para una mayor proporción de los LOS en las ampollas cuando el tiempo de reacción avanza.

Se pueden recuperar rendimientos del 99 % de las ampollas usando tales técnicas.

55 Se observó que EDAC es un excelente agente de reticulación intra-ampolla porque reticuló los LOS a OMP de forma suficiente para una inmunogenicidad dependiente de T de LOS mejorada, pero no reticuló los mismos hasta un grado tan elevado que tuvieron lugar problemas tales como mala capacidad de filtración, agregación y reticulación inter-ampolla. La morfología de las ampollas generadas es similar a la de ampollas no conjugadas (mediante

microscopio electrónico). Además, el anterior protocolo evitó que tuviera lugar una reticulación demasiado elevada (que puede disminuir la inmunogenicidad de las OMP protectoras presentes de forma natural sobre la superficie de la ampolla, por ejemplo, TbpA o Hsf).

Técnicas para aislar ampollas

5 Mediante muchas técnicas conocidas se pueden aislar Vesículas de Membrana Externa (OMV o ampollas) (Fredriksen y col, NIPH Annals (1991), 14, 67-79; Zollinger y col, J. Clin Invest (1979), 63, 836-848; Saunders y col, Infect Immun (1999), 67, 113-119; J. J. Drabick y col, Vaccine (1999), 18, 160-172). Estas se dividen en 2 grupos principales -técnicas que usan desoxicolato (aproximadamente el 0,5 %) para extraer ampollas de meningococo y técnicas que usan niveles bajos de desoxicolato (DOC) o nada de desoxicolato en absoluto. Las ampollas del procedimiento sin DOC tienen la interesante característica de mantener un alto nivel de LOS en la OMV, lo que es ventajoso en una vacuna en la que LOS es un antígeno protector. En comparación con ampollas extraídas con DOC, la concentración de Ag L3 en OMV obtenidas por un procedimiento sin DOC es aproximadamente diez veces superior. Se prefiere un procedimiento sin detergente (preferentemente sin DOC) para preparar ampollas para los fines de los procedimientos de la presente invención por este motivo, aunque la extracción con un tampón que contiene niveles bajos de detergente (preferentemente DOC) también puede ser ventajosa porque la etapa dejaría la mayor parte del LOS de interacción estrecha en la ampolla mientras que eliminaría cualquier LOS retenido de forma suelta más tóxica. Normalmente se usa detergente (preferentemente DOC) al 0-0,5 % y preferentemente al 0,02-0,4 %, 0,04-3 % o al 0,06-2 % para la extracción de la ampolla, más preferentemente al 0,08-0,15 % y mucho más preferentemente aproximada o exactamente al 0,1 % para obtener una cantidad óptima de LOS para estar presente de forma estable en las ampollas. Los procedimientos de extracción sin DOC (o bajo % de DOC -DOC al 0,3 % o inferior) se prefieren particularmente cuando el LOS se ha destoxificado mediante uno o más de los procedimientos que se han detallado anteriormente.

25 Se prefiere que el contenido de LOS de las ampollas en todas las realizaciones de la presente invención sea un contenido del LOS de 3-30, 5-25, 10-25, 15-22 y, mucho más preferentemente, aproximada o exactamente del 20 % cuando se mide por tinción con plata después de electroforesis en SDS-PAGE usando el LOS purificado como patrón (véase el procedimiento de Tsai, J. Biol. Standardization (1986) 14: 25-33). Usando LOS L3 de Nmen como un patrón en este procedimiento, en general, el contenido de LOS en ampollas de inmunotipo L3 de Nmen extraído con DOC al 0,1 % es aproximadamente LOS al 20 %, con DOC al 0,2 % es aproximadamente LOS al 15 %, con DOC al 0,3 % es aproximadamente LOS al 10 % y con DOC al 0,5 % es aproximadamente LOS al 5 %.

30 La producción de ampollas se puede realizar usando cualquier técnica apropiada para separar ampollas de células o restos celulares (por ejemplo, mediante centrifugación a baja velocidad). Las preparaciones de ampolla se pueden purificar adicionalmente mediante el uso de ultracentrifugación (granulando las ampollas) o con técnicas más cuidadosas de ultrafiltración y/o diafiltración como se describe por Frasch y col. "Outer membrane protein vesicle vaccines for meningococcal disease" in Methods in Molecular Medicine, vol 66, Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols 2001 pp81-107 (Editado por A.J. Pollard and M.C. Maiden, Humana Press Totowa, NJ).

Composiciones de vacuna

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden formular fácilmente como composiciones de vacuna añadiendo un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Adicionalmente Se proporciona un procedimiento para preparar las composiciones inmunogénicas o vacunas de Neisseria (preferentemente meningocócicas) de la invención, que comprende las etapas de aislar LOS purificado de la invención como se ha descrito anteriormente o producir ampollas aisladas de la invención como se ha descrito anteriormente y formular el LOS o las ampollas con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, los LOS purificados de inmunotipo tanto L2 como L3 de la invención o las ampollas de inmunotipo tanto L2 como L3 de la invención o un LOS purificado de L2 o L3V y una ampolla de L3 (o viceversa) se combinan en una etapa de mezcla. Preferentemente, el LOS purificado o la ampolla de la invención se ha conjugado como se ha descrito anteriormente después del aislamiento. También se puede añadir una etapa adicional de formulación en liposoma para el LOS purificado (usando técnicas conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, el documento WO 96/40063 y las referencias citadas en ese documento). Preferentemente, las preparaciones de ampolla se aíslan por extracción con bajas concentraciones de (o sin) DOC (como se ha descrito anteriormente).

50 Tales procedimientos de combinación de L2 o L3V y L3 pueden producir una vacuna que es eficaz contra casi todas las cepas de meningococo B.

55 Las anteriores composiciones inmunogénicas (o procedimientos) o vacunas pueden tener añadidos uno o más (2, 3 ó 4) polisacáridos u oligosacáridos meningocócicos (sencillos o conjugados con un vehículo que comprende epítomos de células T, como se ha descrito anteriormente) de los serogrupos A, C, Y o W a la composición. Preferentemente se añade al menos C (más preferentemente se conjuga) y, más preferentemente, A y C o Y y C (preferentemente todos conjugados) y mucho más preferentemente A, C, Y y W (preferentemente todos conjugados). Ventajosamente, también se incluye un polisacárido u oligosacárido capsular de *H. influenzae* B conjugado en las anteriores composiciones para generar una vacuna universal contra meningitis.

Preferentemente, las composiciones que están constituidas por, o que comprenden. composiciones individualizadas específicamente en el documento WO 94/08021 no se reivindican en la presente invención. Opcionalmente, las composiciones que están constituidas por, o que comprenden. composiciones individualizadas específicamente en el documento US2006/0047106 no se reivindican en la presente invención.

5 Formulaciones de Vacuna de la Invención

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden formular con un adyuvante adecuado para generar composiciones de vacuna de la invención.

Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alúmina) o fosfato de aluminio (preferentemente hidróxido de aluminio), pero también pueden ser una sal de calcio (particularmente carbonato cálcico), hierro o cinc o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada o azúcares acilados, polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente o polifosfacenos.

Los sistemas de adyuvante Th1 adecuados que se pueden añadir incluyen Monofosforil lípido A, particularmente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (u otros derivados no tóxicos de LPS) y una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) [o derivados de LPS no tóxicos] junto con una sal de aluminio (preferentemente fosfato de aluminio). Un sistema mejorado implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 [u otra saponina] y 3D-MPL [o derivado de LPS no tóxico] como se describe en el documento WO 94/00153 o una composición menos reactogénica en la que QS21 [o saponina] se inactiva con colesterol como se divulga en el documento WO 96/33739. Una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210 y es una formulación preferida que se puede añadir. Otros adyuvantes que se pueden añadir comprenden una saponina, más preferentemente QS21 y/o una emulsión de aceite en agua y tocoferol. También se pueden añadir CpG no metilados que contienen oligonucleótidos (documento WO 96/02555).

La preparación de las vacunas está descrita en general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press Nueva York").

Se puede administrar una dosis inmunoprotectora de vacunas por la vía sistémica o a través de la mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o administración a través de la mucosa a los tractos oral/alimentario (preferentemente administración intranasal), respiratorio, genitourinario. Normalmente, la cantidad de de ampolla en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que incluye una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en los vacunados típicos. Tal cantidad variará en función de qué inmunógenos específicos se emplean y de la manera en que se presenten. Generalmente, se espera que cada dosis comprenda 1-100 µg de cada ampolla o LOS de la invención, preferentemente 5-50 µg y, más normalmente, en el intervalo de 5-25 µg.

Mejoras adicionales a las composiciones inmunogénicas o vacunas de ampolla de la invención

Las anteriores composiciones de ampolla de la invención se pueden mejorar adicionalmente en eficacia en vacunas de la invención si la cepa de Neisseria de la que se obtienen (incluyendo gonococo y, preferentemente, meningococo, más preferentemente *N. meningitidis* B) tiene uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) regulados por aumento insertando copias adicionales del gen en el genoma o introduciendo un promotor más fuerte cadena arriba del gen existente o cualquiera de los demás modos analizados en el documento WO 01/09350 que sean capaces de inducir cepas modificadas para aumentar 1,2, 1,5, 2, 3, 5 ó 10 veces el nivel de antígeno en comparación con la cepa no modificada: NspA (documento WO 96/29412), Hsf o truncamientos del mismo (documentos WO 99/31132 y WO 01/55182; también conocido como NhhA), Hap (documento PCT/EP99/02766), OMP85 (documento WO 00/23595), PilQ (documento PCT/EP99/03603), PldA (documento PCT/EP99/06718), FrpB (documento WO 96/31618), TbpA (documentos WO92/03467, US5912336, WO93/06861 y EP586266), TbpB (documentos WO93/06861 y EP586266), NadA (Comanducci y col J. Exp. Med. 2002 195; 1445-1454; NMB 1994), FrpA/FrpC o porciones en común entre estos antígenos que implican 5 o más repeticiones de secuencias (documento WO 92/01460; Thompson y col., (1993) J. Bacteriol. 175: 811-818; Thompson y col., (1993) Infect. Immun. 61: 2906-2911), LbpA, LbpB (documento PCT/EP98/05117), FhaB (documento WO98/02547 SEC ID N°: 38 [nucleótidos 3083-9025]), HasR (documento PCT/EP99/05989), lipo02 (documento PCT/EP99/08315), Tbp2 (documento WO 99/57280; NMB 0460), MltA (documento WO 99/57280; NMB 0033), TspA (documento WO 00/03003), TspB (documento WO 00/03003), ctrA (documento PCT/EP00/00135), MafA (NMB 0652), MafB (NMB0643), Omp26 (NMB 0181), Adesina X (NMB 0315), Adesina Y (NMB 0995), Adesina Z (NMB 1119) y OstA (NMB 0280). Ejemplos de secuencias NMB se pueden encontrar en la base de datos en www.neisseria.org. Cuando en el presente documento se menciona Hsf, el término puede ser sustituible en cada caso por truncamientos de Hsf, en particular los descritos en el documento WO 01/55182.

Se prefiere particularmente si tanto Hsf como TbpA (formas de peso molecular Bajo o Alto o tanto Bajo como Alto [documento EP 586266]) o Hsf y OMP85, u OMP85 y TbpA (formas de peso molecular Bajo o Alto o tanto Bajo como Alto) o NspA y Hsf, o NspA y OMP85 o NspA y TbpA (formas de peso molecular Bajo o Alto o tanto Bajo como Alto)

estén los dos regulados por aumento. Cuando están comprendidas 2 ampollas en la composición, se prefiere que cada ampolla tenga regulaciones por aumento diferentes. Si TbpA tanto Alto como Bajo se tienen que regular por aumento, es preferible que los mismos se regulen por aumento en 2 ampollas separadas presentes en la composición obtenidas de 2 cepas que comprenden de forma natural las 2 formas de TbpA. Mucho más preferentemente, las 2 cepas tienen inmunitipos LOS L2 y L3. El TbpA puede estar regulado por aumento genéticamente o mediante cultivo de las cepas de producción de neisseria/meningocócicas en condiciones con limitación de hierro, por ejemplo, en presencia de Desferal 50-70 μM (mesilato de desferoxamina, disponible en Sigma). Si se adopta la última estrategia, se prefiere que la expresión del gen FrpB esté regulada por disminución (preferentemente delecionada) ya que este antígeno variable puede convertirse en inmunodominante en ampollas aisladas de cepas meningocócicas aisladas en condiciones con limitación de hierro.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende una ampolla L3 de una cepa msbBde polisacárido capsular IgtB⁻ (o Ist⁻) preferentemente regulada por aumento en TbpA Alto y Hsf y una ampolla L2 o L3V de una cepa msbB⁻ de polisacárido capsular IgtB⁻ (o Ist⁻) preferentemente regulada por aumento en TbpA Bajo y Omp85. Más preferentemente, ambas ampollas están reguladas adicionalmente por disminución en la expresión de PorA y/o FrpB y, opcionalmente, la expresión de OpC y/o OpA. Las ampollas se aíslan más preferentemente por un procedimiento de bajo contenido de DOC como se ha descrito anteriormente y el LOS en ambas ampollas se reticula intra-ampolla con la proteína de membrana externa.

Vacunas de células fantasma o completas inactivadas

Los inventores consideran que las anteriores composiciones y vacunas que se refieren a ampollas se pueden extender de forma sencilla a procedimientos que hacen referencia a preparaciones y vacunas de células fantasma o completas inactivadas (con ventajas idénticas). Los procedimientos para preparar preparaciones fantasma (células vacías con envueltas intactas) a partir de cepas gramnegativas se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 92/01791). Los procedimientos para inactivar células completas para preparar preparaciones de células inactivadas para uso en vacunas también se conocen bien. Por lo tanto, las composiciones y vacunas que implican ampollas que se describen a lo largo de el presente documento se considera que son aplicables a las mismas composiciones o vacunas que comprenden preparaciones de células fantasma y completas inactivadas equivalentes de la invención

Ensayos bactericidas de suero en las composiciones de la invención

El ensayo bactericida de suero es el procedimiento preferido para evaluar las relaciones sinérgicas entre antígenos cuando se combinan en una composición inmunogénica de la invención.

Tal respuesta sinérgica se puede caracterizar por el SBA provocado por la combinación de antígenos que es al menos el 50 %, dos veces, tres veces, preferentemente cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces y mucho más preferentemente diez veces superior que el SBA provocado por cada antígeno por separado. Preferentemente, el SBA se mide frente a una cepa homóloga de la que se obtienen los antígenos y preferentemente también frente a un panel de cepas heterólogas. (Véase a continuación para un panel representativo, por ejemplo, BZ10 (B:2b:P1.2) que pertenece al agrupamiento A-4; B16B6 (B:2a: P1.2) que pertenece al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1.7,16)). El SBA es el marcador inmunológico más comúnmente convenido para estimar la eficacia de una vacuna meningocócica (Perkins y col. J Infect Dis. 1998, 177:683-691). Se puede evaluar un SBA satisfactorio mediante cualquier procedimiento conocido. Se puede realizar el SBA usando sueros obtenidos de modelos animales o de sujetos humanos.

Un procedimiento preferido para realizar SBA con sueros humanos es el siguiente. Se toma una muestra de sangre antes de la primera vacunación, dos meses después de la segunda vacunación y un mes después de la tercera vacunación (siendo tres vacunaciones en un año un programa de vacunación primario humano típico administrado, por ejemplo, a los 0, 2 y 4 meses o 0, 1 y 6 meses). Tales programas de vacunación primaria humana se pueden realizar en niños menores de 1 año de edad (por ejemplo, al mismo tiempo que vacunaciones de Hib) o niños de 2-4 años de edad o adolescentes también se pueden vacunar para ensayar SBA con tal programa de vacunación primaria. Se puede tomar una muestra de sangre adicional de 6 a 12 meses después de la vacunación primaria y un mes después de una dosis de refuerzo, si es aplicable.

El SBA será satisfactorio para una preparación de antígeno o de ampolla con actividad bactericida homóloga si un mes después de la tercera dosis de vacuna (del programa de vacunación primario) (en niños de 2-4 años de edad o adolescentes, pero preferentemente en niños en el primer año de vida), el porcentaje de sujetos con un aumento de cuatro veces en términos de títulos de SBA (dilución de anticuerpo) (en comparación con título pre-vacunación) frente a la cepa de meningococo de la cual se obtuvieron los antígenos de la invención es mayor del 30 %, preferentemente mayor del 40 %, más preferentemente mayor del 50 % y mucho más preferentemente mayor del 60 % de los sujetos.

Por supuesto, una preparación de antígeno o de ampolla con actividad bactericida heteróloga también puede constituir una preparación de ampolla con actividad bactericida homóloga si también puede provocar SBA satisfactorio frente a la cepa meningocócica de la que se obtiene.

El SBA será satisfactorio para una preparación de antígeno o de ampolla con actividad bactericida heteróloga si un mes después de la tercera dosis de vacuna (del programa de vacunación primaria) (en niños de 2-4 años de edad o adolescentes, pero preferentemente en niños en el primer año de vida), el porcentaje de sujetos con un aumento de cuatro veces en términos de título de SBA (dilución de anticuerpo) (en comparación con el título pre-vacunación) frente a tres cepas heterólogas de meningococo es mayor del 20 %, preferentemente mayor del 30 %, más preferentemente mayor del 35 % y mucho más preferentemente mayor del 40 % de los sujetos. Tal ensayo es una buena indicación de si la preparación de antígeno o de ampolla con actividad bactericida heteróloga puede inducir anticuerpos bactericidas cruzados frente a diversas cepas meningocócicas. Las tres cepas heterólogas deben tener preferentemente un patrón de complejo de tipo electroforético (ET) o tipado de secuencia multilocus (MLST) diferente (véase Maiden y col. PNAS USA 1998, 95: 3140-5) entre sí y preferentemente con la cepa a partir de la cual se prepara o se obtiene la preparación de antígeno o de ampolla con actividad bactericida heteróloga. Un experto en la materia será capaz de forma sencilla de determinar tres cepas con un diferente complejo de ET que reflejan la diversidad genética observada entre meningococos, particularmente entre cepas de meningococos de tipo B que se reconocen como la causa de una carga de enfermedad significativa y/o que representan linajes hipervirulentos de MenB reconocidos (véase Maiden y col. anteriormente). Por ejemplo, las tres cepas que se podrían usar son las siguientes: BZ10 (B:2b:P1.2) que pertenece al agrupamiento A-4; B16B6 (B:2a:P1.2) que pertenece al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1.7,16), que pertenece al complejo ET-5 o cualquier otra cepa que pertenece al mismo ET/Agrupamiento. Tales cepas se pueden usar para ensayar una preparación de antígeno o de ampolla con actividad bactericida heteróloga preparado u obtenida, por ejemplo, de la cepa meningocócica CU385 (B:4:P1.15) que pertenece al complejo ET-5. Otra cepa de muestra que se podría usar es del clon epidémico de Linaje 3 (por ejemplo, NZ124 [B:4:P1.7,4]). Otra cepa ET-37 es NGP165 (B:2a:P1.2)..

En la técnica se conocen procedimientos para medir la actividad de SBA. Por ejemplo, se describe un procedimiento que se podría usar en el documento WO 99/09176 en el Ejemplo 10C. En términos generales, un cultivo de la cepa a ensayar se cultiva (preferentemente en condiciones de agotamiento de hierro -mediante adición de un quelante de hierro tal como EDDA al medio de cultivo) en la fase logarítmica de crecimiento. Esto se puede suspender en un medio con BSA (tal como medio de Hanks con BSA al 0,3 %) para obtener una suspensión celular de trabajo ajusta a aproximadamente 20.000 UFC/ml. Se puede realizar una serie de mezclas de reacción mezclando una serie de diluciones de factor dos de sueros a ensayar (preferentemente inactivados por calor a 56 °C durante 30 min) [por ejemplo, en un volumen de 50 µl/pocillo] y los 20.000 UFC/ml de cepa meningocócica de suspensión a ensayar [por ejemplo, en un volumen de 25 µl/pocillo]. Los viales de reacción se deben incubar (por ejemplo, a 37 °C durante 15 minutos) y agitar (por ejemplo, a 210 rpm). La mezcla de reacción final [por ejemplo, en un volumen de 100 µl] contiene adicionalmente una fuente de complemento [tal como el 25 % de volumen final de suero de cría de conejo preensayado o suero humano para serología humana] y se incuba como anteriormente [por ejemplo, a 37 °C durante 60 min]. Se puede usar una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo en U de poliestireno estéril para este ensayo. Se puede tomar una alícuota [por ejemplo, 10 µl] de cada pocillo usando una pipeta multicanal y descargar en placas agar Mueller-Hinton (que contienen preferentemente Isovitalex al 1 % y Suero de Caballo inactivado por calor al 1 %) e incubar (por ejemplo, durante 18 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %). Preferentemente, se pueden recontar colonias individuales hasta 80 UFC por alícuota. Se pueden usar las siguientes tres muestras de ensayo como controles: tampón + bacteria + complemento; tampón + bacteria + complemento inactivado; suero + bacteria + complemento inactivado. Se pueden calcular los títulos de SBA directamente usando un programa que procesa los datos para dar una medición de la dilución que se corresponde al 50 % de la inactivación celular por un cálculo de regresión.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se llevaron a cabo usando técnicas estándar, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, excepto donde se describa lo contrario en detalle. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

Ejemplo 1:

Los ejemplos que describen delecciones de genes que codifican proteínas implicadas en la producción de polisacárido capsular de meningococo (por ejemplo, MenB), la delección del gen PorA, la regulación por aumento de diversas proteínas de membrana externa protectoras sobre la superficie de ampollas meningocócicas, la regulación por disminución de proteínas inmunodominantes o enzimas biosintéticas (tales como mutaciones siaD(-)) y procedimientos para aislar ampollas se describen en el documento WO 01/09350. Se proporciona información adicional en los documentos WO 2004/014417 y WO 2004/014418. Obsérvese que las referencias a la secuencia de gen NMB y NMA en el presente documento se refieren a los números de referencia para secuencias a las que se puede acceder por www.neisseria.org. Se muestra un esquema que muestra las estructuras convencionales de los inmunotipos de LOS en la Figura 1 (de Kahler y col. 2005 Glycobiology 15: 409-419/2006 JBC 281: 19939-19948). Véase también la Figura 2B.

Ejemplo 2: O-acetilación de LOS de núcleo interno - impacto potencial sobre títulos bactericidas

Resumen

- El análisis de EM-EM ha mostrado que la N-acetil-glucosamina (GlcNAc) del LOS de núcleo interno de la cepa NZ124 (L3) está O-acetilada. Esto no es el caso para las cepas H44/76 y M687 así como para las cepas de vacuna L3 IgtB(+) y L3 Ist(+) (B1854= TrL3 y B 1948= L7, respectivamente) obtenidas de la cepa H44/76.
- La cepa NZ124 no es más resistente a la inactivación por complemento mediada por anticuerpo que las cepas H44/76 y M687
- La accesibilidad de los epítomos de superficie de poca exposición a anticuerpos bactericidas parece ser similar para las cepas NZ124 y H44/76.
- En cinco modelos animales que usan cuatro especies animales, y cualquiera que sea la formulación usada, los sueros de ampollas anti-TrL3 y anti-L7 fueron menos eficaces al mediar la inactivación de la cepa NZ124 en comparación con las cepas H44/76 y M687
- Estos resultados sugieren que la acetilación de la GlcNAc del LOS de núcleo interno podría reducir la eficacia de la inactivación mediada por anticuerpos anti-“LOS no acetilado”.

Introducción

Basándose en análisis EM/EM, se describen dos estructuras diferentes del LOS L3 de *Neisseria meningitidis*. Estas dos estructuras se diferencian por la presencia o no de un grupo acetilo en la GlcNAc del núcleo interno (Figura 2A). En la bibliografía, la estructura L3 se describe sin este grupo acetilo adicional.

La GlcNAc del LOS de núcleo interno de ampollas TrL3 y L7 no está acetilada. Esto también es el caso para las cepas de tipo silvestre H44/76 y M97250687 (M687). Por el contrario, la cepa WT NZ124 posee una GlcNAc acetilada. Estas tres cepas de *N. meningitidis* serogrupo B de WT se inmunotipan como L3. NZ124 es una cepa epidémica de Nueva Zelanda aislada en 1998 y disponible en el New Zealand Institute of Environmental Science and Research, Wellington, Nueva Zelanda.

Los sueros de ratones inmunizados con ampollas TrL3 o L7 contienen altos niveles de anticuerpos bactericidas contra las cepas H44/76 y M687. Sin embargo, estos sueros son menos eficaces contra la cepa NZ124. De hecho, los títulos bactericidas medidos con ampollas anti-L7/TrL3 en la cepa NZ124 son 3-20 veces menores que los títulos medidos en las cepas H44/76 y M687.

Al menos tres hipótesis podrían explicar los menores títulos de anticuerpo bactericida medidos frente a la cepa NZ124:

- esta cepa podría ser de forma intrínseca más resistente a la inactivación mediada por anticuerpos y complemento que las cepas H44/76 y M687;
- en esta cepa, los epítomos de LOS podrían ser menos accesibles a los anticuerpos bactericidas;
- la acetilación del LOS de núcleo interno podría afectar negativamente a la eficacia de la inactivación mediada por anticuerpos anti-LOS “no acetilados”.

Resultados

¿Es la cepa NZ124 más resistente a la inactivación mediada por anticuerpos?

Para contestar a esta cuestión, se han analizado en SBA los sueros de ratones inmunizados con diferentes vacunas de ampollas PorA+. Los antisueros se han ensayado en SBA frente a cepas de PorA homólogas y heterólogas. Los resultados presentados en la Tabla 1 son de dos experimentos..

La inmunización de ratones con ampollas P1.7,16 indujo la producción de anticuerpos bactericidas que eran capaces de mediar en la inactivación de la cepa P1.7,16 de PorA homóloga (título de 1/2300 en H44/76) pero ninguna cepa de PorA heteróloga (M687 y NZ124). Se hizo una observación similar con la vacuna P1.19,15 que solamente fue capaz de inducir una respuesta bactericida protectora frente a la cepa PorA homóloga (título de 1/900 en M687). Los ratones inmunizados con una vacuna que contenía el PorA P1.7,4 tenían niveles altos de anticuerpos bactericidas frente a la cepa NZ124 (título de 1/6200) pero no frente a la cepa H44/76.

Tabla 1: Impacto de inmunización con diferentes ampollas PorA+ sobre la inducción de anticuerpos bactericidas frente a un panel de cepas MenB que expresan diferentes PorA (GMT para inactivación del 50 %)

Cepas analizadas en SBA	Cepa(s) de vacuna		
	H44/76 (P1,7,16)	CU385 (P1,19,15)	CU385-NZ228/98 (P1.19,15+P1.7,4)
H44/76 (P1,7, 16)	2300	<100	<100
M687 (P1,19,15)	<100	900	3800
NZ124 (P1,7,4)	NT	<100	6200

En estos experimentos, se midieron los mayores títulos de anticuerpo bactericida frente a la cepa NZ124, sugiriendo

que esta cepa no es más resistente a la inactivación mediada por anticuerpos y complemento que las cepas H44/76 y M687.

¿Permiten los epítomos de LOS de la cepa NZ124 un buen acceso a los anticuerpos?

5 Se ha sugerido previamente que el tamaño de la cápsula puede limitar la accesibilidad de anticuerpos a los epítomos de superficie NspA especialmente debido a que los bucles de NspA son relativamente pequeños en comparación, por ejemplo, con los bucles VR1 y VR2 de PorA. De hecho, se estableció una relación entre el tamaño de la cápsula y la capacidad de los sueros anti-NspA de inducir la inactivación mediada por complemento (Moe y col, 1999 I&I 67: 5664-75).

10 Debido a que el LOS de N. meningitidis posee una cadena sacarídica corta, la accesibilidad a sus epítomos protectores por anticuerpos se podría alterar por el grosor de la cápsula. Para determinar si tal mecanismo podría explicar los menores títulos bactericidas medidos con anticuerpos anti-LOS en la cepa NZ124, se realizaron ensayos bactericidas con un MAb anti-NspA (MAb Me-7) en tres cepas de MenB diferentes incluyendo NZ124.

15 En presencia de complemento, las cepas H44/76 y NZ124 se inactivaron de forma sencilla por el MAb Me-7 como se demuestra por los títulos bactericidas superiores a 1/2560. Por el contrario, la cepa M687 era más resistente a la inactivación mediada por el MAb anti-NspA; se midió un título de solamente 1/347.

En conclusión, la accesibilidad de los epítomos de NspA protectores es similar para las cepas H44/76 y NZ124. Por lo tanto, se puede postular que la menor eficacia de anticuerpos anti-ampollas Trl3 en la mediación de la inactivación de la cepa NZ124 no se debe a una menor accesibilidad de los epítomos de LOS protectores.

20 **¿Reduce la acetilación de la GlcNAc de LOS de núcleo interno la eficacia de anticuerpos bactericidas anti-LOS “no acetilados”?**

25 Se inmunizaron ratones, conejos, cobayas, crías de rata y ratas adultas con ampollas KO porA. La mayoría de los experimentos se realizó con ampollas obtenidas de cepas que producen LOS de lípido A penta-acilado (mutación msbB, ampollas de B1853, B1854 y B1948) pero también se realizaron unos pocos experimentos con ampollas que contenían LOS hexa-acilados (ampollas B1820). Se ensayaron diferentes formulaciones usando sales de aluminio (Al (OH)3 o AlPO4) o no (formulaciones no adsorbidas) y CpG. Los sueros anti-ampollas se ensayaron en SBA usando complemento de cría de conejo frente a las cepas H44/76, M687 y NZ124.

Los títulos bactericidas medidos con sueros de animales inmunizados con ampollas TrL3 B1820 se muestran en la Tabla 2. Cualquiera que fuese la especie animal, los títulos bactericidas obtenidos con la cepa NZ124 son menores que los títulos bactericidas obtenidos con las cepas H44/76 y M687.

30 *Tabla 2: Impacto de la inmunización de ratones, cobayas y conejos con ampollas B1820 sobre la inducción de anticuerpos bactericidas contra tres cepas de MenB (GMT para inactivación del 50 %)*

Formulación	Ratones			Cobayas			Conejos		
	H44/76	M687	NZ124	H44/76	M687	NZ124	H44/76	M687	NZ124
Al(OH) ₃	300	300	100	40	20	<10	300	300	20
AlPO ₄	3000	5000	800	NT	NT	NT	NT	NT	NT

35 La inmunización con ampollas TrL3 KO msbB (B1853 o B1854) o ampollas L7 KO msbB (B1948) también induce mayores títulos bactericidas de suero contra las cepas H44/76 y M687 que contra la cepa NZ124. Esto se observa en los cinco modelos animales diferentes ensayados: ratones, crías de rata y ratas adultas (Tabla 3a), cobayas y conejos (Tabla 3b) y cualquiera que sea la formulación usada

En conclusión, la inmunización de animales con ampollas que contienen “LOS no acetilado” provocó una respuesta de anticuerpos bactericidas menor contra la “cepa acetilada” (NZ124) que contra las “cepas no acetiladas” (H44/76 y M687).

40

Tabla 3a: Impacto de la inmunización de ratones, crías de rata y ratas adultas con ampollas de TrL3 penta-acetiladas (B1853 o B1854) y L7 (B1948) sobre la inducción de anticuerpos bactericidas contra tres cepas de MenB (GMT para inactivación del 50 %)

Formulación	Ampollas	Ratones			Crías de ratas			Ratas		
		H44	M687	NZ124	H44	M687	NZ124	H44	M687	NZ124
No-ads	B1853/54	3000	1700	250	260	2000	<20	450	5800	<20
	B1948	2600	2900	100	710	230	40	400	2500	<20
Al(OH) ₃	B1853/54	2000	1200	280	30	60	10			
	B1948	1600	940	140	320	480	10			
CpG	B1853/54				640	770	20			
	B1948				3300	1200	60			

5

Tabla 3b :

Impacto de la inmunización de cobayas y conejos con ampollas de TrL3 penta-acetiladas (B1853 o B1854) y L7 (B1948) sobre la inducción de anticuerpos bactericidas contra tres cepas de MenB (GMT para inactivación del 50 %)

Formulación	Ampollas	Cobayas			Conejos		
		H44/76	M687	NZ124	H44/76	M687	NZ124
No-ads	B1853/54		300	2200	<20		
	B1948		1000	500	30		
Al(OH) ₃	B1853/54				400	400	30

Discusiones, conclusiones y perspectivas

10 La inmunización de ratones con ampollas TrL3 o L7 provocó un alto nivel de anticuerpos bactericidas que median en la inactivación de las cepas H44/76 y M687. Estos anticuerpos eran menos bactericidas contra la cepa NZ124 ya que los títulos de SBA medidos con sueros de ratón eran de 3 a 20 veces menores frente a la cepa NZ124 que frente a la cepa H44/76 y M687.

15 Los datos preclínicos sugieren que la cepa NZ124 no es más resistente a la destrucción mediada por complemento de anticuerpos que las cepas H44/76 y M687. Además, existen pruebas que sugieren que los epítomos protectores poco expuestos a superficie de NZ124 no son menos accesibles a anticuerpos que epítomos similares sobre la superficie de la cepa H44/76. Se podrían realizar análisis de microscopía electrónica y/o citometría de flujo para confirmar este hallazgo.

20 Una diferencia entre los LOS de la cepa NZ124 y los LOS de las cepas H44/76 y M687 es la acetilación de la GlcNAc de núcleo interno que se observa solamente en LOS de NZ124. Esta diferencia podría explicar la menor eficacia de sueros de ampollas anti-TrL3 y anti-L7 en la mediación de la inactivación de la cepa NZ124 en comparación con las cepas H44/76 y M687. De hecho, se conoce que la acetilación de epítomos sacarídicos protectores puede influir positiva o negativamente en el reconocimiento de tales epítomos por anticuerpos. Sin embargo, el impacto de acetilación/no acetilación sobre la inmunogenicidad/antigenicidad de epítomos protectores descritos en una especie animal no se observa siempre en otra especie animal y en seres humanos.

25 El impacto de la acetilación en epítomos sacarídicos sobre su inmunogenicidad varía de acuerdo con la "especie animal", pero también de acuerdo con los antígenos. Sin embargo, en el caso de MenB, se han realizado observaciones similares en los cinco modelos animales ensayados. Estas observaciones comunes entre 4 especies animales diferentes sugieren que los anticuerpos bactericidas inducidos por la inmunización con "LOS no acetilados" podrían ser menos eficaces en la mediación de la inactivación de cepas "acetiladas", tales como la cepa NZ124.

30 Para confirmar esta hipótesis, se desarrollará un ensayo bactericida de suero usando una segunda cepa acetilada L3 (cepa BZ10). Además, también se planea el desarrollo de SBA usando cepas modificadas genéticamente tales como una cepa H44/76 acetilada y una cepa NZ124 desacetilada. Basándose en estos resultados, se podrían evaluar nuevas ampollas de L3 (con GlcNAc acetilada)

35 Ejemplo 3: O-acetilación de LOS de núcleo interno -el gen de neisseria para O-acetilación de núcleo interno de LOS

En la parte superior de la composición de azúcar de la cadena alfa, la "decoración" de heptosa II parece tener un impacto sobre la inmunogenicidad de LOS. Los números y posiciones de PEA, la presencia de una Glucosa en la posición 3, la presencia de una Glicina en la posición 7 y la O-acetilación de GlcNAc parecen ser determinantes importantes de protección cruzada.

El gen ***lpt3*** (MacKinnon y col. 2002 Mol Microbiol. 43: 931-943) expresa la enzima que añade **PEA en la posición 3** en la Heptosa II. El gen (NMB2010) no tiene variación de fase.

5 El gen ***lgtG*** expresa la enzima que añade una **Glucosa en la posición 3** en la Heptosa II. Este gen tiene variación de fase (véase el documento WO04/015099). Este gen está deletado en varias cepas de *N. m.*, solo o en combinación con *lpt6*.

El gen ***lpt6*** (Wright y col. 2004 J Bact. 186: 6970-6982) expresa la enzima que añade **PEA en la posición 6** en la Heptosa II. El gen (NMA0408) está deletado en varias cepas de *N. m.*, solo o en combinación con *lgtG*. El gen no tiene variación de fase *lpt6* e *lgtG* se localizan en la misma región en el cromosoma denominado *lgt3*.

La enzima que añade PEA en la posición 7 en la Heptosa II es desconocida.

10 La enzima que añade Glicina en la posición 7 en la Heptosa II es desconocida.

La enzima que añade O-Aceto en GlcNAc era desconocida hasta el presente estudio.

Identificación del gen de O-acetilación

15 • Después de estudios BLAST con la proteína OafA (de Salmonella; homóloga a O-acetilasa de Haemophilus Hi0391 + Hi0392) en genomas de Neisseria traducidos (*N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* MenB MC58, MenC FAM18 y MenA Z2491), se encontraron dos familias de genes en Neisseria denominadas *oac1* (representada por el gen de MC58 NMB0285) y *oac2* (representado por el gen de MC58 NMB1836) estando la familia *oac1* más próxima a OafA que *oac2*.

• Ambos genes tienen variación de fase: presencia de un tramo poliG en el ORF.

20 • En MC58 (LOS no O-acetilado), el gen *oac1* (NMB0285) está fuera de fase mientras que el *oac2* (NMB1836) está en fase.

• Se obtuvieron productos de PCR correspondientes a *oac1* y *oac2* para cada cepa ensayada.

• El tramo poliG se secuenció para investigar la funcionalidad por el tramo poliG.

Presencia y funcionalidad de gen NMB0285 y NMB1836 en cepas de *N. m.* de SBA

25 Datos analíticos obtenidos por ARD con EM-EM (espectrometría de masas). Presencia/funcionalidad de los genes determinada por biología molecular. Los números entre paréntesis son los números de G en el tramo de poliG en el ORF del gen

cepas	Tipo de cepa	Inmunotipo	O-Ac (ARD)	oac1 (NMB0285)		oac2 (NMB1836)	
				presencia (PCR)	funcionalidad	presencia (PCR)	funcionalidad
H44/76	B	L3	-	+	- (6)	+	+ (10)
760676	B	L2	+	+	+ (5)	+	- (14)
NZ124	B	L3	+	+	+ (5)	+	- (11)
BZ10	B	L3	+	+	+ (5)	+	- (9)
M687	B	L3	-	+	- (6)	+	+ (13)
B16B6	B	L2	+	+	+ (5)	+	- (15)
6275(B2003)	B	L3V	+	+	+ (5)	+	- (12)
2986	B	L2	+	+	+ (5)	+	+ (10)
C11(B1983)	C	L3V	+	+	+ (5)	+	- (14)
CC19	C		+	+	+ (5)	+	- (8)
YS1975	Y		+	+	+ (5)	+	+ (13)
YMO1-0240539	Y		+	+	+ (5)	+	- (12)
W3193	W	L3	-	+	- (5*)	+	-
WS4383	W		+	+	+ (5)	+	- (12)
AF8238	A	L11	+	+	+ (5)	+	+ (7)
A3048	A		+	+	+ (5)	+	+ (10)
A3125	A	L10	+	+	+ (5)	+	+ (13)

* 1 sustitución que introduce una TERMINACIÓN antes del tramo de G

Conclusión

- Correlación perfecta (16/16) entre la funcionalidad del gen NMB0285 y la detección de un grupo O-acetilo por EM-EM.
- Ninguna correlación (7/16) entre la funcionalidad del gen NMB1836 y los datos obtenidos por EM-EM.
- Existen fuertes pruebas de que el gen de O-acetilación en *Neisseria* es **NMB0285**.

La Figura 3B muestra el gen de O-acetilación de LOS de *N. meningitidis* NMB 0285 (oac 1) de la cepa MC58 (idéntico al 100 % con la secuencia génica del marco de lectura abierto de la cepa H44/76). Marco de lectura abierto en el caso superior, las secuencias circundantes (por ejemplo, la secuencia del promotor) en el caso inferior. Obsérvese que la secuencia de 6 G en el marco de lectura abierto (subrayado) hace que el marco de lectura abierto esté fuera del marco. En la Figura 3A, se muestra el gen equivalente NMA2202 (oac1) de la cepa Z2491. Obsérvese que la secuencia de 5 G en el marco de lectura abierto (caso superior) hace que la fase de lectura abierta esté en marco.

1136-GGG GGG ATA TTG AA-1150 MC58

1136-GGG GGA TAT TGA A-1149 Z2491 (NMA 2202)

También está en el marco para la cepa 760676 (Figura 3C) [identidad del 97 % entre la secuencia génica de fase de lectura abierta de oac1 de H44/76 y 760676].

En la cepa W3193 el LOS no estaba acetilado incluso aunque tenía 5G en la región que se ha descrito anteriormente. Esto se observó que se debía a un tramo poli G adicional en el gen que comienza en el nucleótido 354 del ORF. 4 G están presentes en el gen en esta posición para las cepas MC58, 760676 y NZ124 (en fase, gen activo) y se encontraron 3 G en W3193 (fuera de fase, explicando su estado des-O-acetilado).

Inactivación del gen de O-acetilación en NZ124

El gen equivalente NMB0285 (oac1) se anuló en NZ124, una cepa L3 que está O-acetilada (con oac1 en una configuración activa) y es más resistente a suero inducido por ampollas obtenidas de H44/76 (no acetiladas). La inactivación del gen de O-acetilasa se confirmó en primer lugar por análisis de espectrometría de masas y el mutante KO se usará en el análisis SBA para investigar adicionalmente la implicación de O-acetilación de LOS en la protección cruzada de la vacuna.

- Se secuenció el locus de NMB0285 de NZ124 (Figura 4D) y compartía el 98,6 % de identidad con el locus equivalente de MC58 de NMB0285 (confirmación de un número G “EN FASE” en NZ124). Después de la terminación, existe una secuencia adicional similar a IS1106, también presente en MC58 y 760676, que está ausente en NZ124.
- Se construyó un plásmido KO de NMB0285 (vector pMG-T-easy) que contenía la región 5' y 3' recombinante de NZ124 que se corresponde a las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen de O-Acetilación. Se introdujo un marcador KanR en sustitución del gen NMB0285. Este plásmido se denominó **pRIT 15574**.
- Se construyó la cepa KO de oac 1 de NZ124 -el LOS obtenido de la misma está des- O-acetilado- mostrando adicionalmente que oac1 es la O-acetilasa de LOS de Nmen.

Gen de O-Acetilación ON en nuevas cepas obtenidas de L3

Las ampollas obtenidas de la cepa H44/76 son del inmunitipo L3 (no acetilado). Ya que las ampollas tienen una capacidad reducida para inducir anticuerpos bactericidas contra las cepas O-acetiladas de L3 (por ejemplo, NZ124, BZ10), se propone reintroducir un gen de O-acetilación funcional (oac1) en la cepa de producción de ampolla obtenida de H44/76.

Estrategia

- Sustitución del gen de H44/76 NMB0285 (gen desconectado) por el gen NZ124 (cepa ON O-ac).
- Se incluyeron secuencias promotoras y de regulación cadena arriba de NZ124 (se insertó el ORF de NZ124 y los 448 pb cadena arriba de NZ124).
- La inserción tuvo lugar usando un gen de resistencia a eritromicina en orientación con sentido.
- Se analizó la importancia de la O-Acetilación de LOS L3 de ampolla sobre la eficacia de protección heteróloga de vacuna (para observar si había inactivación mejorada de NZ124 por ampollas de H44/76 modificadas del anterior modo). También se analizará una combinación de esta ampolla de L3 con ampollas de una cepa L2 O-acetilada 760676 para buscar producción de anticuerpo bactericida heterólogo.

Resultados

- Lo anterior se realizó y se demostró que el LOS resultante de la cepa H44/76 modificada estaba O-acetilado en HepII por espectrometría de masas.

Ejemplo 4: Caracterización de los LOS de las cepas 6275 y C11 por el procedimiento de Ouchterlony (inmunotipificación), análisis de EM/EM y análisis de biología molecular

Resumen

- Se realizó el inmunotipificación de las cepas 6275 y C11 por inmunodifusión usando anticuerpos policlonales específicos (procedimiento de Ouchterlony). La composición de LOS de núcleo interno se determinó por análisis de EM/EM. Los genes que codifican las enzimas implicadas en la decoración de núcleo interno de LOS se analizaron mediante PCR y secuenciación.
- Basándose en el análisis de EM/EM, la cepa 6275 posee dos restos PEA en la Hep II. Esta cepa se sometió a inmunotipificación como una cepa L3, aunque las cepas convencionales de L3 tienen solamente una PEA (en la posición 3 en HepII).
- Se observaron dos composiciones diferentes del LOS de núcleo interno de la cepa C11 mediante EMEM. Una población contiene un resto PEA en la Hep II mientras que la segunda población contiene dos restos PEA. La cepa se sometió a inmunotipificación como una cepa de L3 también con una reacción muy débil con sueros anti-L2.

Introducción

La composición de LOS de núcleo interno de LOS de *Neisseria meningitidis* parece ser más compleja que la que se ha descrito previamente. Hasta fechas recientes se postulaba que el LOS de núcleo interno no contiene PEA o solamente un resto PEA en la Hep II en la posición 3 ó 6 (7). Pero recientemente se describió un nuevo LOS de núcleo interno con dos restos PEA en la posición 3 y en la posición 6 (o 7). Debido a que esta nueva estructura de LOS se describió a partir de una cepa inmunotipada previamente como L3, esta nueva estructura de LOS se ha denominado L3v por variante de L3.

Antes del descubrimiento de la estructura de L3v, los datos epidemiológicos basados en el inmunotipificación de LOS han demostrado que aproximadamente el 70 % de las cepas de serogrupo B invasivas eran L3 (PEA en la posición 3) y que la mayor parte de las cepas remanentes eran L2 (PEA en la posición 6).

Basándose en los datos bactericidas obtenidos con un panel de cepas de L3 y L2 y sueros de animales inmunizados con ampollas obtenidas de L3 o ampollas obtenidas de L2, se ha concluido que solamente los sueros obtenidos de anti-L3 son capaces de mediar en la destrucción por complemento de cepas L3 mientras que solamente los sueros anti-L2 son capaces de destruir cepas L2. Pero, de forma interesante, los datos bactericidas obtenidos en dos nuevas cepas de L3v no están de acuerdo con las conclusiones previas. De hecho, la destrucción por complemento de estas dos cepas está mediada por sueros obtenidos anti-L2 pero no sueros anti-L3. Estas dos cepas "atípicas" son la cepa 6275 de serogrupo B y la cepa de referencia de serogrupo C C11.

Para comprender los resultados divergentes entre inmunotipo y resultados bactericidas, la composición de núcleo interno de las cepas 6275 y C11 se determinó por EM/EM. Además, el inmunotipificación de estas cepas se realizó usando el procedimiento de Ouchterlony (inmunodifusión usando sueros policlonales específicos). También se analizó la presencia de los genes *lpt3*, *lpt6* e *lgtG* funcionales usando procedimientos de biología molecular. Estos genes codifican enzimas responsables de la adición de Hep II de una PEA en la posición 3, una PEA en la posición 6 y una Glucosa en la posición 3, respectivamente.

Resultados**1. Composición de núcleo interno por análisis de EM/EM**

Los análisis de EM/EM (véase la Figura 4) muestran que:

- En ambas cepas, el LOS de cadena es el típico tetrasacárido LNnT descrito para cepas L2 y L3 con un grupo de ácido siálico terminal.
- El LOS de núcleo interno de la cepa 6275 posee dos restos PEA más probablemente en las posiciones 3 y 6 (7), pero a confirmar por análisis de RMN.
- La cepa C11 estaba compuesta por dos núcleos internos diferentes:
 - una población con una PEA (su posición en Hep II no está definida, pero se observa una señal débil para una glicina en Hep II que excluye una PEA en la posición 7)

- una segunda población con dos PEA (más probablemente en la posición 3 y 6 debido a que también se detectó una glicina en esta Hep II)
- Para ambas cepas no se detecta glucosa en Hep II.

2. Inmunotipificación de LOS

5 El inmunotipificación se realizó usando un panel de antisueros específicos. Solamente se describen a continuación los resultados obtenidos con el antisuero L3 y el antisuero L2 debido a que los resultados con los demás antisueros (L1, L4, L5...) eran negativos para las cepas 6275 y C11. En estos experimentos, las cepas 6275 y C11 usadas actualmente en GSK Bio (GSK6275-1 &2 y GSK C11) se compararon con cepas similares conservadas en un congelador durante más de 20 años en la Universidad de Ámsterdam (cepas Zol 6275 y RIV C11).

10 Las dos cepas 6275 (Zol 6275 y GSK6275-1&2) tienen un comportamiento similar en el ensayo de inmunotipificación. Reaccionan intensamente con el suero anti-L3 pero no con el suero anti-L2.

La cepa GSK C11 y la cepa RIV C11 también presentan resultados idénticos. Ambas cepas son positivas con el suero anti-L3 y débilmente positivas con el suero anti-L2.

15 Para confirmar la precipitación muy débil obtenidas con las cepas C11 y el suero anti-L2, se realizaron nuevos experimentos de inmunodifusión en combinación con aislados de 5 pacientes tipados previamente como L3,2 en 1980. Los resultados de C11 muestran de nuevo precipitaciones muy débiles con el suero anti L2 mientras que se confirma el tipado de las 5 cepas de enfermedad.

Cepas	Serogrupo	Tipado 1980	Tipado 2006
2991	B	L3,(2)	L3,2
3072	W	L3,2	L3,2
3146	C	L3,(2)	L3,(2)
3151	W	L3,2	L3,2
3356	B	L3,2	L3,2
GSKC11	C		L3,(2)
RIVC11	C		L3,(2)

20 **3. Caracterización molecular**

La enzima que añade la PEA en la posición 3 se ha identificado y se codifica por el gen lpt3. Se detecta una PEA en la posición 3 en Hep II en el 70 % de cepas hipervirulentas de N. meningitidis y Wright y colaboradores detectaron el gen lpt3 mediante PCR en el 86 % de las cepas analizadas. Este gen no está regulado por variación de fase y se observó que estaba parcialmente deletado en diversas cepas de serogrupo C y A. Se planteó la hipótesis que la adición de una PEA en la posición 3 estaba en competición con la adición de glucosa en la misma posición. La enzima implicada está codificada por el gen lgtG (véase el documento WO04/015099), regulado por variación de fase con un tramo de poliC en el ORF. La hipótesis del laboratorio Moxon es que, si el ORF de lgtG está presente y en el marco, se produce una enzima funcional, se añade glucosa en la posición 3 y no se añade una PEA en esa posición.

30 El gen que codifica la enzima que añade una PEA en la posición 6 es lpt6, localizado al lado del gen lgtG. Este gen no contiene regiones susceptibles a ser reguladas por variación de fase y se detectó en el 48 % de N. m. (Wright y col, 2004). El gen que codifica la enzima que añade una Glicina en la posición 7 en Hep II no se conoce..

La cepa 6275 de MenB y la cepa C11 de menC se analizaron en paralelo con cepas de referencia correspondientes de L3 y L2 Se realizaron experimentos de amplificación por PCR y secuenciación:

- 35 • Mientras que se evaluó la presencia de una copia completa del gen lpt3 (PCR), se prosiguieron investigaciones sobre la funcionalidad del gen lgtG (presencia por PCR y secuencia del tramo poliC en el ORF)
- Se evaluó la presencia del gen lpt6 mediante PCR. Si está presente una copia completa del gen, se postulará que la cepa contiene LOS con una PEA en la posición 6.

40

PCR y análisis de secuencia de genes <i>lpt3</i> , <i>lpt6</i> e <i>lgtG</i>				
	<i>lpt3</i>	<i>lgtG</i>		<i>lpt6</i>
	Presencia	Presencia	Funcionalidad	Presencia
H44/76 (L3)	+	+	-	-
NZ124 (L3)	+	-	-	-
B16B6 (L2)	+	+	+	+
760676 (L2)	+	+	+	+
6275	+	+	+	+
C11	+	+	+	+

- 5 Basándose en estos datos, las cepas de menB 62875 y de menC C11 parecen estar relacionadas con el inmunotipo L2. Sin embargo, el análisis de EM/EM muestra para ambas cepas dos grupos de PEA y nada de Glucosa. El * indica que el gen *lgtG* tiene 14 en lugar de 11 (el número normal observado en genes activos) nucleótidos C consecutivos en la región de variación de fase. Aunque esto significa que la fase de lectura abierta está en fase y, por tanto, puede producir una proteína funcional, también es posible que la adición de un resto de Prolina adicional pueda alterar la estructura de la proteína y, por tanto, su función.

4. Resumen

- 10 La siguiente tabla resume la caracterización de diferentes cepas meningocócicas usando diferentes procedimientos

Cepas	Inmunotipificación	Destrucción SBA		EM/EM		Caracterización molecular		
		Anti-TrL3	Anti-TrL2	PEA	Glc	<i>lpt3</i>	<i>lpt6</i>	<i>lgtG</i> funcional
H44/76	L3	+	-	1	-	+	-	-
NZ124	L3	+	-	1	-	+	-	-
760676	L2	-	+	1	+	+	+	+
B16B6	L2	-	+	1	+	+	+	+
6275	L3	-	+	2	-	+	+	+
C11	L3 (2)	-	+	1 & 2	-	+	+	+

Discusiones

- 15 La diversidad de la composición de LOS de núcleo interno es más compleja que la que se había descrito previamente. Inicialmente, se representaron cepas sin o con un grupo de PEA en Hep II (en la posición 3 ó 6/7) pero recientemente se describieron cepas con dos grupos de PEA. Tales cepas son, por ejemplo, la cepa 6275 del serogrupo B y la cepa C11 del serogrupo C.

- 20 Sorprendentemente, los resultados de inmunotipificación y los resultados bactericidas de suero obtenidos con las cepas 6275 y C11 no están de acuerdo. De hecho, estas dos cepas se tipan como cepas L3 pero su inactivación está mediada por sueros de ampollas obtenidas de anti-L2 y no de sueros de ampollas obtenidas de anti-L3 (véase el siguiente ejemplo).

- 25 Se planteó una cuestión con respecto a la relevancia de estas cepas y si la presencia de dos grupos de PEA podría ser un artefacto de laboratorio debido a pases de cultivo *in vitro* sucesivos. Tuvo la oportunidad de comparar diferentes siembras de cepas 6275 y C11. Para cada cepa, una siembra usada actualmente por los inventores se comparó con una siembra más antigua almacenada durante más de 20 años (en la Universidad de Ámsterdam). Para cada cepa, las dos siembras han mostrado el mismo comportamiento en el ensayo de Ouchterlony sugiriendo ausencia de deriva al menos durante los últimos 20 años. Sin embargo, la composición de LOS de núcleo interno de las siembras más antiguas se debe determinar para confirmar la presencia de dos restos PEA.

De acuerdo con la bibliografía, aproximadamente el 70 % de las cepas meningocócicas invasivas son L3. Los resultados de Ouchterlony obtenidos con cepas L3v sugirieron que este procedimiento no diferencia entre cepas L3 y L3v. Por lo tanto, el número de cepas “L3 verdaderas” se podría sobreestimar en ambos estudios. Los genes *Ipt3* e *Ipt6* son responsables de la adición del grupo de PEA en la posición 3 y 6 en Hep II, respectivamente. Aproximadamente el 36 % de las cepas circulantes contienen ambos genes, el 50 % poseen solamente *Ipt3* y el 12 % poseen solamente *Ipt6* (Wright JC y col, 2004). Por lo tanto, potencialmente el 36 % de las cepas podrían ser L3v incluso si se tipan como L3. Sin embargo, los datos epidemiológicos recientes obtenidos con un panel de MAB específicos para diferentes estructuras de LOS de núcleo interno sugirieron que menos del 2 % de las cepas tienen dos grupos de PEA en Hep II (Gidney MAJ y col, Infect Immun. 2004 72: 559-69). La diferencia entre estos dos estudios (el 36 % frente al 2 %) se podría explicar mediante la mayor sensibilidad a complemento humano de las cepas que poseen un grupo de PEA en la posición 6 (Ram S y col J Biol Chem. 2003 278:50853-62). en conjunto, todos los datos sugieren que la mayoría de las cepas invasivas son “L3 verdadera”.

Se sugirió que *IgtG* e *Ipt-3* compiten por la posición O-3 de Hep II, con una desviación descrita para la adición del resto Glc con respecto al resto PEA (Wright JC y col 2004). Esta hipótesis puede no ser una regla universal como se demuestra por la presencia de dos restos PEA en el LOS de núcleo interno de las cepas 6275 y C11 incluso en presencia de un gen *IgtG* funcional (a menos que el gen *IgtG* en fase con 14 nucleótidos C en la región de variación de fase no sea activo -véase anteriormente). Además de la hipótesis del laboratorio Moxon se describió recientemente otro sistema implicado en la regulación/composición de la estructura de núcleo interno de LOS de la cepa NmB. Este sistema es el sistema regulador de dos componentes MisR/MisS (Tzeng YL y col J Biol Chem. 2004 279:35053-62). En conclusión, los mecanismos implicados en la composición de LOS de núcleo interno parecen ser múltiples y no se han aclarado completamente.

Cinco cepas aisladas de pacientes presentaron un inmutotipo de LOS sorprendente debido a que muestran una precipitación predominante con sueros anti-L3 pero también una precipitación más débil con suero anti-L2. Esto también es el caso de la cepa C11 incluso si la precipitación con el suero anti-L2 es muy débil. El análisis de EM/EM del LOS de núcleo interno de la cepa C11 también muestra dos composiciones de núcleo interno diferentes parcialmente de acuerdo con la co-expresión de LOS L3 y L2. El LOS L3 identificado por inmunoprecipitación podría ser en realidad un LOS L3v (con dos restos PEA) mientras que el LOS L2 debe estar relacionado con LOS de núcleo interno que posee una PEA en la posición 6 (a confirmar por análisis de RMN) incluso en ausencia de Glc detectable que debe estar presente en alguna molécula de LOS debido a la detección de un gen *IgtG* aparentemente funcional en la cepa C11. Sin embargo, se debe realizar el análisis (EM/EM, caracterización molecular y SBA) del LOS de núcleo interno de uno o más de estos aislados de pacientes para confirmar que estas cepas L3,2 co-expresan LOS L3v y L2.

En conclusión, las cepas que poseen dos grupos de PEA en su núcleo interno se inmutotipan como cepas L3, pero esta inmutotipificación no está de acuerdo con la reactividad biológica en SBA y análisis de la presencia de genes *IgtG*, *Ipt3* e *Ipt6* “funcionales”. Los datos indican que estas cepas L3v probablemente no proceden de cepas L3 (debido a la presencia del gen *Ipt6*) y, por tanto, se deben renombrar.

Ejemplo 5: Vacuna de *Neisseria meningitidis*: composición bivalente de vacunas a base de ampollas ricas en LOS

Cepas de producción de ampolla usadas (inmutotipo, modificaciones genéticas, etc.)

Cepa	Basado en:	LOS	<i>siaD</i> -	<i>porA</i> -	<i>msbB</i> -	<i>IgtB</i> -	<i>Ist</i> -	<i>frpB</i> -	<i>TrHsfup</i>
B1854	H44/76	TrL3	X	X	X	X		X	X
B1948	H44/76	L7	X	X	X		X	X	X
B1900	760676	TrL2	X	X	X	X			
B1987	760676	TrL2	X	X	X	X		X	
B1971	760676	L2	X	X	X			X	
B1984	760676	L2	X	X	X		X	X	

Producción de ampollas de cultivo realizado con o sin desferal

- Se produjeron ampollas B 1854, B1948, B1971, B1984 y B1987 a partir de cultivos en presencia de desferal
- Se obtuvieron ampollas B 1900 de un cultivo sin desferal

Procedimientos

Procedimiento animal: Se inmunizaron grupos de 30 ratones tres veces con OMV (que contenían aproximadamente

5 el 15-20 % de LOS destoxificado) por la vía intramuscular (IM) el día 0, 21 y 28. Cada inoculación estaba compuesta por 5 µg (contenido de proteína) de OMV no adsorbidas. Las OMV se produjeron a partir de cepas de Neisseria meningitidis (Nmen) modificadas de tal forma que los polisacáridos capsulares y PorA estaban regulados por disminución y el LOS destoxificado (mutación msbB). Las cepas de producción (véase la anterior tabla) se obtuvieron de la cepa H44/76 de tipo silvestre modificada genéticamente (en este caso, expresaron el LOS L7 o el LOS TrL3) o la cepa 760676 de tipo silvestre modificada genéticamente (en este caso, expresaron el LOS L2, sialilado o no, o el LOS TrL2). Se aislaron ampollas de cepas desarrolladas en las condiciones de cultivo que se han descrito anteriormente. El día 42 se tomaron muestras de sangre para el análisis por el ensayo bactericida de suero (SBA) usando un panel de cepas de Neisseria meningitidis (véase la tabla 1). Se realizaron SBA en muestras de 10 sangre combinadas o en sueros individuales (de 10 a 30 sueros por grupo).

Se realizaron experimentos con crías de rata del siguiente modo. Se inmunizaron grupos de 20 ratas de siete días de edad por la vía IM el día (0, 14, 28 y 63). Cada inoculación estaba compuesta por 10 µg (contenido de proteína) de ampollas no adsorbidas. Se tomaron muestras de sangre 14 días después de la cuarta inyección.

15 Se realizaron experimentos con cobayas del siguiente modo. Se inmunizaron grupos de 20 cobayas por la vía IM el día (0, 14, 28). Cada inoculación estaba compuesta por 20 µg (contenido de proteína) de ampollas no adsorbidas. Se tomaron muestras de sangre 14 días después de la tercera inyección.

Se realizaron experimentos con conejos del siguiente modo. Se inmunizaron grupos de 5 conejos blancos New Zealand por la vía IM el día (0, 21, 42). Cada inoculación se preparó a partir de 20 µg (contenido de proteína) de ampollas no adsorbidas. Se tomaron muestras de sangre 14 días después de la tercera inyección.

20 SBA usando cultivo en líquido con desferal: Se cultivaron cepas de N. meningitidis durante una noche en placas de Petri con MH + Polyvitex al 1 % + suero de caballo al 1 % a 37 °C + CO₂ al 5 %. Se sub-cultivaron durante 3 horas en un medio TSB líquido complementado con 50 µM de desferal (quelante de hierro) a 37 °C con agitación para alcanzar una DO de aproximadamente 0,5 a 470 nm. Las muestras de suero se inactivaron durante 40 min a 56 °C y después se diluyeron 1/10 o 1/50 en PBS-glucosa al 0,1 % y después se diluyeron dos veces (8 diluciones) en un volumen de 25 µl en microplacas de fondo plano. Las bacterias se diluyeron en PBS-glucosa al 0,1 % para producir 5300 UFC/ml y 18,8 µl de esta dilución se añadieron a la dilución de suero. También se añadió complemento de conejo (6,2 µl) a cada pocillo. Después de 75 min de incubación a 37 °C con agitación, se añaden 50 µl de MH + agar al 0,9 % a los pocillos y 50 µl de PBS + agar al 0,9 % aproximadamente 30 min más tarde. Las microplacas se incuban durante una noche a 37 °C + CO₂. Las UFC se recuentan y se calcula el porcentaje de inactivación. El título de SBA es la dilución que da el 50 % de destrucción.

35 SBA usando cultivo en agar (sin desferal): Se cultivaron cepas de N. meningitidis durante una noche en Placas de Petri con BHI + suero de caballo al 1 % a 37 °C + CO₂ al 5 %. Se sub-cultivaron durante 4 horas en BHI + suero de caballo al 1 % a 37 °C + CO₂ al 5 %. Las muestras de suero se inactivaron durante 40 min a 56 °C y después se diluyeron 1/10 en PBS-glucosa al 0,1 % y después se diluyeron dos veces (8 diluciones) en un volumen de 25 µl en microplacas de fondo plano. Las bacterias se diluyeron en PBS-glucosa al 0,1 % para dar 6400 UFC/ml y 12,5 µl de esta dilución se añadieron a la dilución de suero. También se añadió complemento de conejo (12,5 µl) a cada pocillo. Después de 75 min de incubación a 37 °C con agitación se añaden 50 µl de TSB + agar al 0,9 % a los pocillos y 50 µl de PBS + agar al 0,9 % aproximadamente 30 minutos más tarde. Las microplacas se incuban durante una noche a 35 ó 37 °C + CO₂. Las UFC se recuentan y se calcula el porcentaje de inactivación. El título de SBA es la dilución que da el 50 % de destrucción.

Composiciones de LOS de núcleo interno de diferentes inmunotipos

- L3 = una PEA en HepII (más probablemente en la posición 3) y ningún Acetilo adicional en la GlcNAc de núcleo interno
- 45 • "L3" = una PEA en HepII (más probablemente en la posición 3) y un Acetilo adicional en la GlcNAc de núcleo interno
- L2 = una PEA en HepII (más probablemente en la posición 6) y un Acetilo adicional en la GlcNAc de núcleo interno
- Variante = dos PEA en HepII (más probablemente en las posiciones 3 y 6) y un Acetilo adicional en la GlcNAc de núcleo interno; aunque obsérvese que en la cepa W3193 no estaba presente Oac en HepII
- 50 • L10 y L11 = estructuras no determinadas
- L3, "L3", L2 y variante albergan el tetrasacárido LNnT (sialilado o no).

Resultados

Los resultados resumidos en la siguiente Tabla 1 y la Figura 5 muestran que

- Las ampollas obtenidas de L2 inducen anticuerpos bactericidas contra cepas L2 de NmenB pero no contra

ES 2 390 291 T3

cepas L3 de NmenB (excepto para la cepa M97250687), mientras que las ampollas obtenidas de L3 inducen una respuesta protectora contra cepas L3 y "L3" de NmenB, contra la cepa 3125 (L10) del serogrupo A y la cepa M01.0240539 (M01.539 en la tabla) del serogrupo Y pero no contra cepas L2. La estructura del LOS L10 de 3125 por espectrometría de masas se muestra en la Figura 6.

- 5 • Además, las ampollas obtenidas de L2 inducen protección contra cepas que albergan un LOS variante (cepas 6275 de NmenB y C11 de NmenC) y también contra otras cepas del serogrupo C (C19), serogrupo Y (S1975), serogrupo A (F8238, L11) y serogrupo W-135 (cepas S4383 y 3193).
- 10 • Una vacuna bivalente a base de ampollas de LOS enriquecidas obtenidas de cepas L2 y L3 induce una respuesta protectora (anticuerpos bactericidas) contra todas las cepas ensayadas (cualquiera que sea el serogrupo y el inmunotipo de LOS) (se tiene que ensayar una vacuna bivalente con OMV de L2 NS y TrL3)
- 15 • El LOS L2 no trucado induce una mejor "protección cruzada" que mutantes IgtB (=TrL2). Esto no es el caso para ampollas obtenidas de L3 (TrL3=L7).
- Las ampollas de L2 no sialiladas inducen un nivel similar de anticuerpos bactericidas que las ampollas de L2 sialiladas (al menos contra la cepa 6275).
- De acuerdo con las cepas dirigidas en SBA, se observan o no interferencias con las vacunas bivalentes que indican que se requiere un ajuste fino de la formulación bivalente/composición para garantizar la mejor eficacia (títulos SBA) contra todas las cepas ensayadas.
- La decoración del núcleo interno tiene un gran impacto sobre la inducción de anticuerpos bactericidas cruzados.

20 Tabla 1. Anticuerpos bactericidas cruzados inducidos por vacunas de OMV enriquecidas en LOS monovalentes y bivalentes. Títulos de SBA (para el 50 % de destrucción) y seroconversión .

Cepas	Grupo	LOS	Vacunas (no adsorbidas)						
			L7 (B1948)	L2 (B1971)	L7+L2	TrL3 (B1854)	TrL2 (B1900)	TrL3+TrL2	Tampón
H44/76	B	L3	4979	<100	5267	5507	<100	12754	<100
M97250687	B	L3	10123	3800	5739	>51200	469	>51200	<100
NZ124	B	"L3"	479	<20	228	949	<20	523	<20
760676	B	L2	<20	329	213	<20	104	40	<20
2986	B	L2	<200	5288	2670	<200	1486	1486	<200
B16B6	B	L2	<100	1746	1401	<100	2236	1097	<100
6275	B	Variante	<20 0 %	267 100 %	43 60 %	<20 0 %	28 60 %	<20 5 %	<20 0 %
6275*	B	Variante	<100	2748	1456	<100	657	456	<100
C11	C	Variante	<20 0 %	2767 100 %	1303 100 %	<20 0 %	405 100 %	176 100 %	<20 0 %
S1975	Y	Variante	<200 %	>5120 100 %	>5120 100 %	<20 20 %	>5120 100 %	2205 100 %	<20 10 %

ES 2 390 291 T3

(continuación)

M01.539	Y	??	235 100 %	18 20 %	140 75 %	168 89 %	19 20 %	76 70 %	<20 20 %
F8238	A	L11	142 100 %	>5120 100 %	>5120 100 %	42 60 %	3469 100 %	1665 100 %	<20 10 %
3125	A	L10	82 88 %	14 20 %	NT	207 100 %	<20 0 %	NT	<20 0 %
S4383	W	"L3"	54 55 %	1259 100 %	NT	NT	NT	NT	NT
3193	W	Variante	<20 0 %	>5120 100 %	NT	NT	NT	NT	NT
<p>H44/76, M97250687, NZ124, 760676, 2986 y B16B6: SBA en sueros combinados. Otras cepas: SBA en sueros individuales Cepas no de serogrupo B y cepas L2: SBA realizado de cultivos en agar sin desferal (a diferencia de excepciones)</p> <p>§ Media de dos ensayos usando cultivo en líquido + desferal</p> <p>* Sueros combinados ensayados usando cultivo en agar (sin desferal)</p>									

Los resultados en la Tabla 2 muestran que

- 5 • La protección cruzada otorgada por ampollas obtenidas de L2 (L2 con o sin ácido siálico terminal y TrL2) contra cepas que no son de serogrupo B y la cepa 6275 también se observa en cobayas, conejos y crías de rata.
- 10 • En general, las ampollas obtenidas de L2 no son capaces de inducir un nivel significativo de Ab bactericidas capaces de mediar en la inactivación por complemento de cepas L3 excepto la cepa M97250687 (M687 en la tabla) (los datos de la cepa H44/76 usando sueros de crías de rata y de conejo no son fiables y se tienen que repetir debido al fondo de actividades medidas en sueros negativos).
- En cobayas, las ampollas de TrL2 parecen inducir un mayor nivel de anticuerpos bactericidas que a las ampollas de L2 Ist- y L2 mientras que en crías de rata, ratones y conejos se observa la siguiente clasificación: L2 ≥ L2 Ist- ≥ TrL2.
- 15 • Esos resultados muestran que la sialilación de LOS L2 no se requiere para inducir la inducción de anticuerpos bactericidas y que las ampollas de TrL2 (mutación lgtB) también son capaces de provocar la producción de anticuerpos bactericidas (como LOS de TrL3).

Tabla 2. Anticuerpos bactericidas cruzados inducidos por OMV obtenidas de L2 enriquecidas en LOS monovalentes. Títulos de SBA (para el 50 % de destrucción) y seroconversión (%).

	MenB						MenA L11 F8238	MenC Variante C11	MenY Variante S1975	MenW L3 S4383	
	760676	L2 B16B6	2986	H44/76	L3 M687	NZ124					Variante 6275
Crias de rata											
TrL2 (B1987)	PIV	463	129	1447	410	122	50	1822	143	6446	6010
L2lst-(B1984)	PIV	1812	486	4396	2188	138	50	385	365	8923	1577
L2 lst+(B1971)	PIV	1519	996	5294	110	168	983 ?	961	554	11000	1478
Ctrl(-)	PIV	50	50	50	360	50	50	50	50	50	154
Ratones											
TrL2 (B1987)	PIII	186	1692	6081	50	107	10	410	1131	2661	2782
L2 lst-(B1984)	PIII	232	1645	7557	50	321	10	748	1804	8032	1371
L2 lst+(B1971)	PIII	790	1330	8216	50	582	10	1305	2525	11731	1040
Ctrl(-)	PIII	50	50	50	50	50	10	50	50	50	50
Cobayas											
TrL2 (B1987)	PIII	>12800	8129	4194	50	182	50	7253	627	10207	7200
L2 lst-(B1984)	PIII	>12800	5473	6608	594	770	123 ?	7326	1491	>12800	5417
L2 lst+(B1971)	PIII	>12800	5945	6484	457	527	50	4148	1051	5967	5036
Ctrl(-)	PIII	50	50	50	50	50	50	50	50	665	50
Conejos											
TrL2 (B1987)	Pré	59	50	50	562	50	50	50	50	50	50
L2 lst+(B1971)	Pré	752	362	346	134	50	50	157	66	636	723
L2 lst-(B1984)	Pré	63	50	50	318	50	50	50	50	50	50
Ctrl(-)	Pré	1541	507	430	307	72	50	317	122	1386	1238
L2 lst+(B1971)	Pré	50	50	50	178	50	50	50	50	50	62
Conejos											
L2 lst-(B1984)	Pré	4727	1540	551	116	90	50	750	224	2419	3667
Ctrl(-)	Pré	50	50	50	73	50	50	50	50	50	173
Pré	PIII	50	50	50	236	50	50	50	50	50	372

Los SBA se realizaron con sueros combinados a excepción de los sueros de conejo, que se analizaron individualmente.

Conclusión: Una combinación de vacunas LOS a base de L2 y L3 puede provocar anticuerpos que pueden inactivar cepas Men A, B, C, W135 e Y -es la primera vez que esto se ha demostrado. Las vacunas a base de L2 pueden matar cepas L2, variantes (L3v) y cepas L11. Las vacunas a base de L3 pueden matar cepas "L3" (menos bien) y cepas L10. Aunque las cadenas alfa truncadas (lgtB(-)) y de longitud completa (o lst(-)) pueden matar, las truncadas parecen ser beneficiosas para las vacunas L3 y las de longitud completa (o lst(-)) parecen ser beneficiosas para vacunas L2. Una combinación de estas dos vacunas a base de LOS muestra mucho potencial como una vacuna contra *N. meningitidis*.

Ejemplo 6 Vacuna de Neisseria meningitidis: las OMV bivalentes (obtenidas de L7 y obtenidas de L2) inducen protección cruzada contra cepas ABCWY

10 Procedimientos

Procedimientos animales:

- Se inmunizaron grupos de 30 ratones tres veces con formulación de OMV bivalente (OMV obtenida de L3 + OMV obtenida de L2 que contiene aproximadamente el 15-20 % de LOS destoxificado) por la vía intramuscular (IM) el día 2, 21 y 28. Cada inoculación estaba compuesta por 0,8 µg + 0,8 µg (contenido de LOS) de OMV no adsorbidas. Las OMV se produjeron a partir de cepas de *Neisseria meningitidis* (Nmen) modificadas de tal forma que los polisacáridos capsulares y PorA estaban regulados por disminución y LOS destoxificados (mutación msbB). Las cepas de producción se obtuvieron de la cepa H44/76 de tipo silvestre modificada genéticamente (L3) o la cepa 760676 de tipo silvestre modificada genéticamente (L2) (véase a continuación una tabla que describe las modificaciones genéticas y condiciones de cultivo). El día 42, se tomaron muestras de sangre para el análisis por ensayo bactericida de suero (SBA) usando un panel de 22 cepas de *Neisseria meningitidis* de los serogrupos A, B, C, W135 (W) e Y. Se realizaron SBA en muestras de sangre combinadas. Los sueros eran de los experimentos 20060425 y 20060426.
- Se realizó el experimento con crías de rata del siguiente modo. Se inmunizaron ratas de siete días de edad (n=20 por grupo) por la vía IM el día (0, 14, 28 y 63). Cada inoculación estaba compuesta por 1,6 µg + 1,6 µg (contenido de LOS) de OMV no adsorbidas. Se tomaron muestras de sangre 14 días después de la cuarta inyección y se combinaron (experimento 20060484).
- Se realizó el experimento con cobayas del siguiente modo. Se inmunizaron grupos de 20 cobayas por la vía IM el día (0, 14, 28). Cada inoculación estaba compuesta por 1,6 µg + 3,2 µg (contenido de LOS) de OMV no adsorbidas. Se tomaron muestras de sangre 14 días después de la tercera inyección y se combinaron (experimento 20060487).
- Se realizó el experimento con conejos del siguiente modo. Se inmunizaron grupos de 5 conejos blancos New Zealand por la vía IM el día (0, 21, 42). Cada inoculación estaba compuesta por 3,2 µg + 3,2 µg (contenido de LOS) de OMV no adsorbidas. Se tomaron muestras de sangre antes de la primera inyección y 14 días después de la tercera inyección y se ensayaron individualmente en SBA (experimento 20060486).

35 Cepas de producción de OMV (inmunotipo) y modificaciones genéticas

		<i>siaD</i> -	<i>porA</i> -	<i>msbB</i> -	<i>lgtB</i> -	<i>lst</i> -	<i>frpB</i> -	TrHsfup	NspA up
B1854	TrL3	X	X	X	X		X	X	
B1948	L7	X	X	X		X	X	X	
B2084	TrL2	X	X	X	X				X
B2071	NSL2	X	X	X		X			X

Producción de OMV de cultivo realizado con o sin desferal

Se produjeron OMV de B1854 y B1948 de cultivos realizados con desferal

40 Se obtuvieron OMV de B2071 y B2084 de un cultivo realizado sin desferal

SBA: Se cultivaron cepas de *N. meningitidis* durante una noche en Placas de Petri a 37 °C + CO₂ al 5 %. Se subcultivaron durante 4 horas en Placas de Petri con o sin desferal (quelante de hierro) a 37 °C + CO₂ al 5 %. Las muestras de suero se inactivaron durante 40 min a 56 °C y después se diluyeron 1/10 ó 1/50 en PBS-glucosa al 0,1 % y después se diluyeron dos veces en un volumen de 25 µl en microplacas de fondo plano. Entonces se añadieron 25 µl de una mezcla de bacterias (diluidas en PBS-glucosa al 0,1 % para dar -100-150 UFC por pocillo) y

complemento de cría de conejo (concentración final en micropocillo: 12,5 % v/v) a la dilución sérica. Después de 75 min de incubación a 37 °C con agitación se añadieron 2 capas de agar (0,9 %) a los pocillos. Las microplacas se incubaron durante una noche a 35 ó 37 °C +CO₂. Las UFC se recontaron y se calculó el porcentaje de inactivación. El título de SBA es la dilución que proporciona el 50 % de inactivación.

5 Composiciones de LOS de núcleo interno de diferentes inmunotipos

- L3 = una PEA en HepII (más probablemente en la posición 3) y sin ningún Acetilo adicional en GlcNAc de núcleo interno
- "L3" = una PEA en HepII (más probablemente en la posición 3) y un Acetilo adicional en GlcNAc de núcleo interno
- 10 • L2 = una PEA en HepII (más probablemente en la posición 6) y un Acetilo adicional en GlcNAc de núcleo interno
- Variante = dos PEA en HepII (más probablemente en posiciones 3 y 6) y, en general, un Acetilo adicional en GlcNAc de núcleo interno;
- L10 y L11 = estructuras no determinadas completamente
- 15 • L3, "L3", L2 y la variante albergan el tetrasacárido LNnT (sialilado o no).

Resultados

Basándose en un aumento de cuatro veces de los títulos bactericidas (usando muestras de suero combinadas de animales de control o de muestra de suero pre-vacuna como comparador), los resultados (véase la tabla en la siguiente página) muestran que

- 20 • Las formulaciones bivalentes no adsorbidas que contienen OMV de L7 + NSL2 u OMV de TrL3 + TrL2 que son capaces de otorgar una protección cruzada contra cepas de *N. meningitidis* que pertenecían a los serogrupos A, B, C, W e Y.
- Esta protección cruzada se observa no solamente en ratones sino también en crías de rata, cobayas y conejos.
- 25 • Sin embargo, estas formulaciones no son capaces de provocar una respuesta protectora contra cepas que expresan el inmunotipo de LOS L4. En estos experimentos, los sueros no son bactericidas contra una cepa L10.
- La mayoría de las cepas que expresan LOS L3 o "L3" o variante o L2 se inactivan por sueros de ratón, cría de rata y cobaya. Frente a estas cepas, el porcentaje de protección cruzada está próximo al 90 %.
- La protección cruzada parece ser menor en conejos.

Conclusión

- 30 Una vacuna bivalente a base de OMV obtenida de cepas de *N. meningitidis* L3 y L2 es capaz de otorgar protección contra las cepas de *N. meningitidis* que expresan LOS L3 o "L3" o variante (L3v) o L2. Esta protección no está restringida a ningún serogrupo dado.

Tabla: Anticuerpos bactericidas cruzados inducidos por vacunas de OMV enriquecidas en LOS bivalentes. Títulos de SBA (para el 50% de inactivación).

		L3 o "L3"			Variante			Variante (y L3 o "L3" o L4?)				L4?										L10	L11
		B	B	B	B	B	W	Y	B	B	B	C	C	C	B	B	B	B	B	W	W	A	A
		14476	M67250687	NZ124	S3448	8275	3193	S1975	BZ10	2991	508B	C11	891	C19	760876	B1898	2986	3856	BZ232	3151	S4383*	3125	F6238
Ratones	L7+NSL2	3292	1611	132	54	7122	12734	25600	84	11947	25600	1023	10	10	3050	1148	7326	22	10	1261	1041	10	4240
	TrL3+TrL2	40960	2542	504	112	5985	18153	25600	1124	25600	9371	1105	10	10	2450	415	3929	34	10	4178	2164	22	4348
Cris de rata	L7+NSL2	614	257	45	10	1340	8817	7817	148	40960	2426	333	10	10	2158	382	836	78	10	564	400	21	2164
	TrL3+TrL2	702	8495	10	10	430	5635	9148	51	40960	1452	514	10	10	312	321	1200	284	60	362	174	10	2531
Cobeyes	L7+NSL2	1178	682	153	158	4520	5715	7200	87	25600	25600	392	59	63	2271	4722	3486	80	10	3046	1226	74	2111
	TrL3+TrL2	3092	10278	47	10	2914	5844	25600	10	25600	11200	1269	52	71	3362	3248	4308	23	76	2138	1179	44	6594
Conejos	L7+NSL2	482	305	47	10	515	1085	2497	91	4287	2568	144	10	13	1047	304	1262	76	10	805	2816	60	391
	TrL3+TrL2	196	514	22	10	50	2558	6760	41	4364	1263	293	10	10	111	50	5801	16	10	348	1278	16	1280

■ Títulos de SBA post-vacunación que no muestran un aumento de al menos cuatro veces (en comparación con muestras sanguíneas de control o muestras sanguíneas previas)

* La cepa S3483 es inmunológicamente una cepa L2 o L3v pero estructuralmente una L3II (sin Glucosa en el interior y sin gen fpt6)

Ejemplo 7: Impacto de OAc sobre inmunogenicidad de OMV de L7

Procedimientos

Procedimientos animales:

5 - Se inmunizaron grupos de 30 ratones tres veces con OMV (que contenía aproximadamente el 15-20 % de LOS destoxificados) por la vía intramuscular (IM) el día 0, 21 y 28. Cada inoculación estaba compuesta pgr 0,8 (contenido de LOS) de OMV no adsorbidas. Las OMV se produjeron a partir de cepas de N. meningitidis modificadas de tal forma que los polisacáridos capsulares y PorA estaban regulados por disminución y el LOS destoxificado (mutación msbB). Las cepas de producción se obtuvieron de la cepa H44/76 de tipo silvestre modificada genéticamente (véase a continuación una tabla que describe las modificaciones genéticas y las condiciones de cultivo). El día 42 se tomaron muestras de sangre para análisis por el ensayo bactericida de suero (SBA) usando cepas de N. meningitidis. Se realizaron SBA en sueros individuales. Los sueros eran del experimento 20060634.

- Se realizó el experimento con cobaya del siguiente modo. Se inmunizaron grupos de 20 cobayas por la vía IM el día (0, 14, 28). Cada inoculación se preparó a partir de 0,2 (contenido de LOS) de OMV no adsorbidas. Se tomaron muestras de sangre 14 días después de la tercera inyección (experimento 20060636).

15 Cepas de producción de OMV (inmutotipo) y modificaciones genéticas

		<i>siaD</i> -	<i>porA</i> -	<i>msbB</i> -	<i>lst</i> -	<i>frpB</i> -	TrHsfup	<u>nmb0285</u>
B1948	L7 OAc-	X	X	X	X	X	X	OFF
B2103	L7 OAc+	X	X	X	X	X	X	ON
Las OMV de B1948 y B2103 se produjeron a partir de cultivos de crecimiento con desferal								

20 SBA: : Se cultivaron cepas de N. meningitidis (H44/76 y M97250687 que son OAc- y NZ124 que es OAc+) durante una noche en Placas de Petri a 37 °C + 5 % CO₂. Se subcultivaron durante 4 horas en Placas de Petri con desferal (quelante de hierro) a 37 °C + 5 % CO₂. Las muestras de suero se inactivaron durante 40 min a 56 °C y después se diluyeron 1/10 ó 1/50 en PBS-glucosa al 0,1 % y después de diluyeron dos veces en un volumen de 25 µl en microplacas de fondo plano. Después se añadieron 25 µl de una mezcla de bacterias (diluidas en PBS-glucosa al 0,1 % para dar ~100-150 UFC por pocillo) y complemento de cría de conejo (concentración final en micropocillo: 12,5 % v/v) a las diluciones de suero. Después de 75 min de incubación a 37 °C con agitación se añadieron 2 capas de agar (0,9 %) a los pocillos. Las microplacas se incubaron durante una noche a 35 ó 37 °C +CO₂. Las UFC se contaron y se calculó el porcentaje de inactivación. El título de SBA es la dilución que da el 50 % de inactivación.

Resultados

30 En ratones, las OMV de L7 OAc+ son más inmunogénicas que las OMV de L7 OAc- (véase la siguiente tabla). De hecho, los sueros de ratones inmunizados con OMV de L7 OAc+ muestran una mayor actividad bactericida mediada por complemento que los sueros de ratones inmunizados con OMV de L7 OAc-. Esto se observa frente a cepas de tipo silvestre OAc- y OAc+. Sin embargo, se observan diferencias significativas solamente frente a cepas OAc- (H44/76 y M97205687)..

Tabla: Anticuerpos bactericidas inducidos por OMV de L7 OAc-(B1948) y OMV de L7 OAc+ (B2103) en ratones. GMT (para el 50 % de inactivación) e intervalos de confianza del 95 %.

	OMV de B1948 (OAc-)	OMV de B2103 (OAc+)
H44/76	3699 (1987 - 6886)	9122* (6381 - 13041)
M97,250687	2768 (1741 - 4401)	7780* (5594 - 10820)
NZ124	117 (61 - 225)	191 (105 - 348)
*p<0,05 en comparación con GMT para ratones B1948 inmunizados		

35 En cobayas, ambos tipos de OMV muestran en SBA una inmunogenicidad similar frente a cepas de tipo silvestre OAc+ y OAc- (véase la siguiente tabla).

Anticuerpos bactericidas inducidos por OMV de L7 OAc-(B1948) y OMV de L7 OAc+ (B2103) en cobayas. GMT (para el 50 % de inactivación) e intervalos de confianza del 95 %.

ES 2 390 291 T3

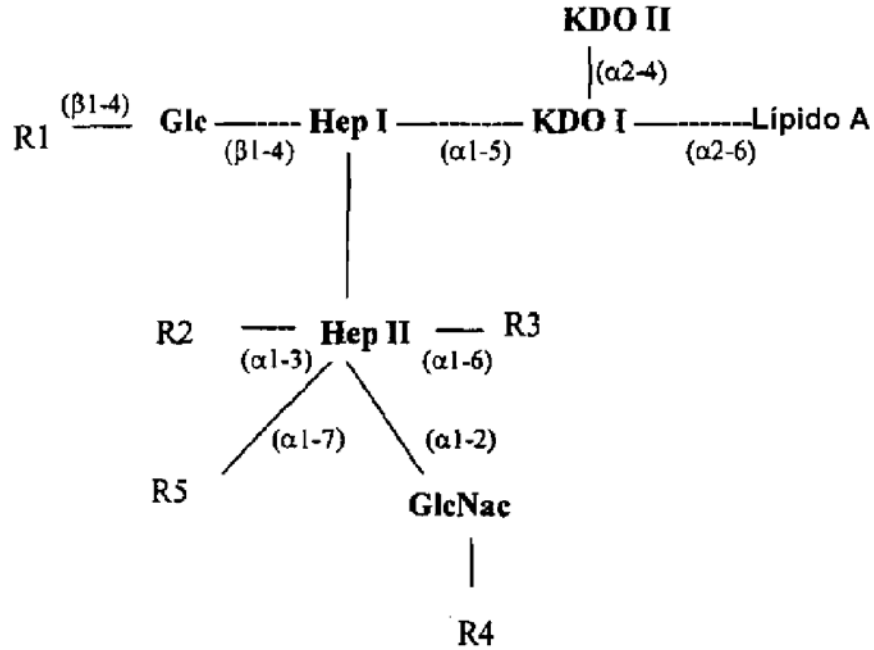
	OMV de B1948 (OAc-)	OMV de B2103 (OAC+)
H44/76	1283 (896 - 1836)	1392 (876 - 2212)
NZ124	69 (38 - 128)	43 (25 - 74)

Conclusión

- 5 Se ha demostrado que la O-acetilación de GlcNAc de núcleo interno aumenta la inmunogenicidad (título de SBA) de OMV en ratones pero no en cobayas.

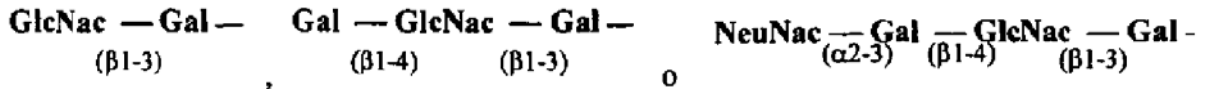
REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende LOS L3V y LOS L3 de cepas de *Neisseria*, en la que los LOS L3 y L3V tienen la siguiente estructura:



- 5 en la que para el LOS L3V:

R1=



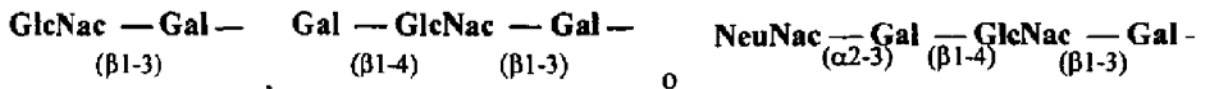
R2 = PEA,

R3 = PEA,

- 10 R4 = H o OAc, R5 = H, PEA, o Gly,

Y en la que para el LOS L3:

R1 =



- 15 R2 = PEA,

R3 = H,

R4 = H o OAc,

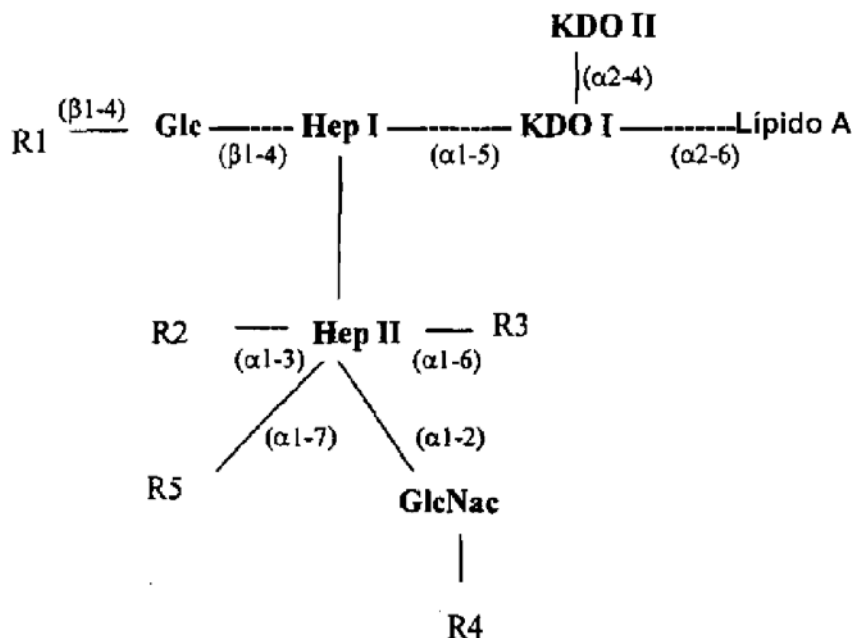
R5 = H o Gly

que además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20

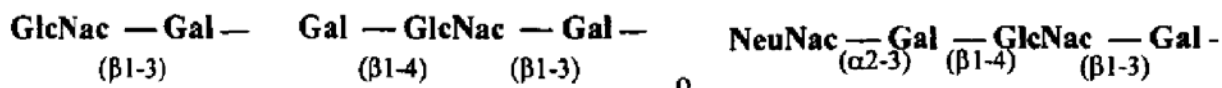
2. La vacuna de la reivindicación 1, que comprende además LOS L10 de una cepa de *Neisseria*, aislado opcionalmente de una cepa A, B, C, W135 o Y de *Neisseria meningitidis*.

3. La vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que la composición comprende además LOS L4 de la estructura siguiente:



en la que para el LOS L4:

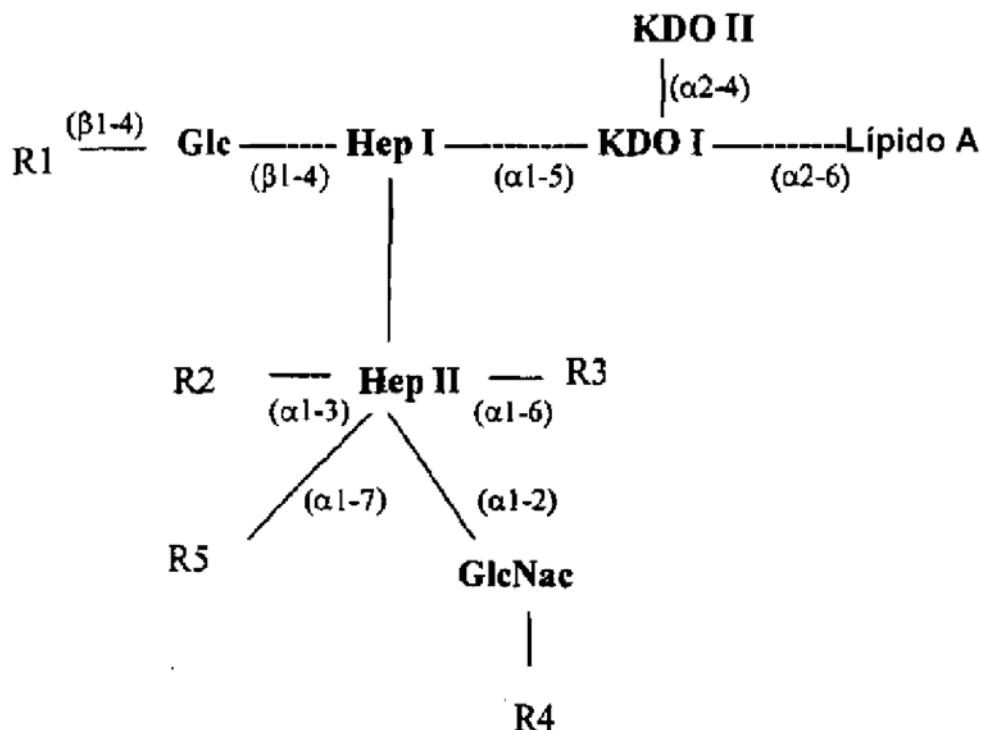
- 5 R1 =



R2 = H,
 R3 = PEA,
 R4 = OAc,
 R5 = Gly.

- 10
4. La vacuna de la reivindicación 3, en la que el LOS L4 tiene R4 = H en lugar de OAc y/o tiene R5 = H en lugar de Gly.
5. La vacuna de las reivindicaciones 1-4, en la que el LOS L3V se aísla de una cepa A, B, C, W135 o Y *N. meningitidis*.
- 15 6. La vacuna de las reivindicaciones 1-5, en la que el LOS L3 se aísla de una cepa A, B, C, W135 o Y de *N. meningitidis*.
7. La vacuna de las reivindicaciones 1-6, en la que LOS L3V, LOS L3, LOS L10, LOS L4, LOS L3V y L3, LOS L3V y L10, LOS L3 y L10, LOS L4 y L3V, LOS L4 y L3, LOS L4 y L10, LOS L3V y L3 y L10, LOS L3V y L3 y L4, LOS L3V y L4 y L10, LOS L3 y L4 y L10 o LOS L3V y L3 y L10 y L4 se conjugan con un vehículo de proeína.
- 20 8. La vacuna de las reivindicaciones 1-7, en la que LOS L3V, LOS L3, LOS L10, LOS L4, LOS L3V y L3, LOS L3V y L10, LOS L3 y L10, LOS L4 y L3V, LOS L4 y L3, LOS L4 y L10, LOS L3V y L3 y L10, LOS L3V y L3 y L4, LOS L3V y L4 y L10, LOS L3 y L4 y L10 o LOS L3V y L3 y L10 y L4 tienen un resto de lípido A destoxificado, que, por ejemplo, carece de una cadena de acilo secundaria consistente con el LOS que se ha aislado de una cepa msbB(-) de neisseria.
- 25 9. La vacuna de las reivindicaciones 1-8, en la que LOS L3V, LOS L3, LOS L10, LOS L4, LOS L3V y L3, LOS L3V y L10, LOS L3 y L10, LOS L4 y L3V, LOS L4 y L3, LOS L4 y L10, LOS L3V y L3 y L10, LOS L3V y L3 y L4, LOS L3V y L4 y L10, LOS L3 y L4 y L10 o LOS L3V y L3 y L10 y L4 están presentes en la composición inmunogénica como una preparación de LOS purificado.

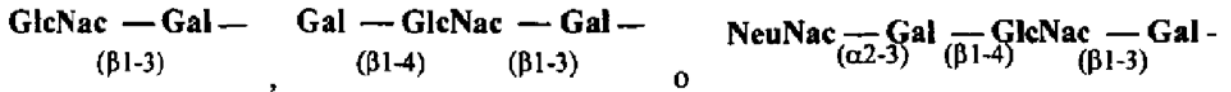
10. La vacuna de las reivindicaciones 1-9, en la que LOS L3V, LOS L3, LOS L10, LOS L4, LOS L3V y L3, LOS L3V y L10, LOS L3 y L10, LOS L4 y L3V, LOS L4 y L3, LOS L4 y L10, LOS L3V y L3 y L10, LOS L3V y L3 y L4, LOS L3V y L4 y L10, LOS L3 y L4 y L10 o LOS L3V y L3 y L10 y L4 están presentes en la composición inmunogénica como una preparación de liposoma.
- 5 11. La vacuna de las reivindicaciones 1-10, en la que LOS L3V, LOS L3, LOS L10, LOS L4, LOS L3 V y L3, LOS L3 V y L10, LOS L3 y L10, LOS L4 y L3 V, LOS L4 y L3, LOS L4 y L10, LOS L3 V y L3 y L10, LOS L3V y L3 y L4, LOS L3 V y L4 y L10, LOS L3 y L4 y L10 o LOS L3 V y L3 y L10 y L4 está presentes en la composición inmunogénica como una preparación de ampolla.
- 10 12. Una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de la vacuna de las reivindicaciones 1-11, uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares conjugados obtenidos de las siguientes cepas: Serogrupo A de meningococo, serogrupo C de meningococo, serogrupo W-135 de meningococo, serogrupo Y de meningococo y *H. influenzae* de tipo b, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 13. Un uso de la vacuna de las reivindicaciones 1-11 o la vacuna de la reivindicación 12 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedad provocada por uno o más serogrupos de *N. meningitidis* seleccionados entre la siguiente lista: A, B, C, W135 e Y.
14. Una vacuna de las reivindicaciones 1-12 para usar en la prevención o el tratamiento de enfermedad provocada por uno o más serogrupos de *N. meningitidis* seleccionados entre la siguiente lista: A, B, C, W135 e Y.
- 20 15. Un procedimiento para fabricar la vacuna de las reivindicaciones 1-12, que comprende la etapa de aislar el LOS L3V y el LOS L3, combinar los LOS L3V y L3 y formular los LOS L3V y L3 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
16. Una composición inmunogénica que comprende LOS L3V de una cepa de *Neisseria* para usar en la prevención o el tratamiento de enfermedad por inmunotipo L2 de *N. meningitidis* o una composición inmunogénica que comprende LOS L2 de una cepa de *Neisseria* para usar en la prevención o el tratamiento de enfermedad por inmunotipo L3V, en el que el LOS L3V tiene la estructura siguiente:



25

en la que:

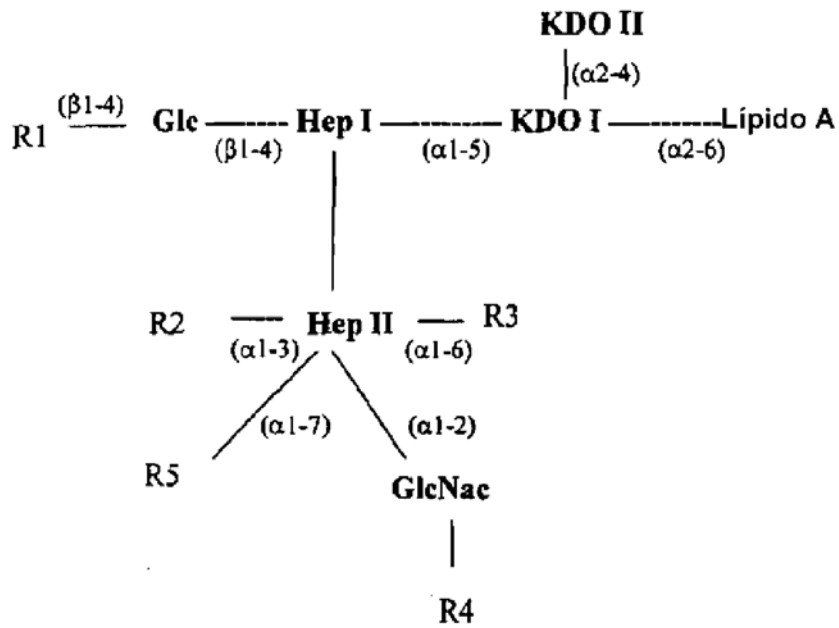
R1 =



- R2 = PEA,
- R3 = PEA,
- R4 = H o OAc,
- R5 = H, PEA o Gly.

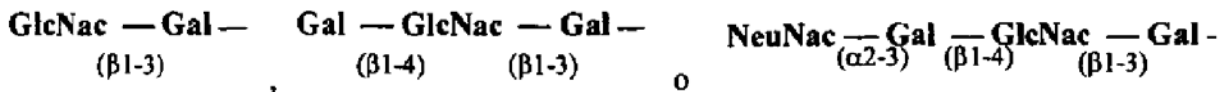
5

17. La composición inmunogénica de la reivindicación 16, en la que el LOS L2 tiene la estructura siguiente:



en la que:

R1 =

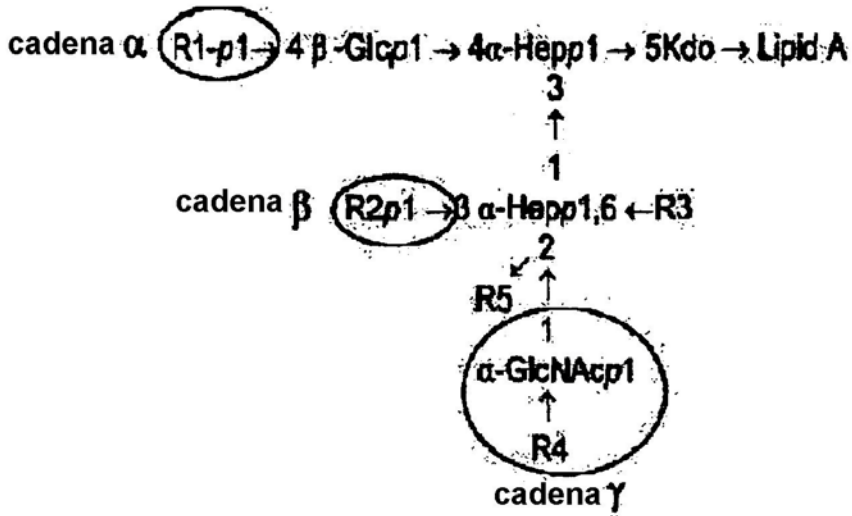


10

- R2 = Glc,
- R3 = PEA,
- R4 = H o OAc,
- R5 = H, PEA o Gly.

15

Figura 1



Inmunotipo

- L1
 R1 = $\alpha\text{-Galp(1-4)}\beta\text{-Galp}$
 R2 = 3-PEA
 R3 = H
 R4 = Ac
- L2
 R1 = $\alpha\text{-Nau5Ac(2}\rightarrow\text{3)}\beta\text{-Galp1}\rightarrow\text{4}\beta\text{-GlcPNAc1}\rightarrow\text{3}\beta\text{-Galp}$
 R2 = $\alpha\text{-GlcP}$
 R3 = 6-PEA
 R4 = Ac (40%)
 R5 = Gly α O-7 PEA*
- L3
 R1 = $\alpha\text{-Nau5Ac(2}\rightarrow\text{3)}\beta\text{-Galp1}\rightarrow\text{4}\beta\text{-GlcPNAc1}\rightarrow\text{3}\beta\text{-Galp}$
 R2 = 3-PEA
 R3 = H
 R4 = H
 R5 = Gly
- L4
 R1 = $\alpha\text{-Nau5Ac(2}\rightarrow\text{3)}\beta\text{-Galp1}\rightarrow\text{4}\beta\text{-GlcPNAc1}\rightarrow\text{3}\beta\text{-Galp}$
 R2 = H
 R3 = 6-PEA
 R4 = Ac (50%)
 R5 = Gly
- L5
 R1 = $\alpha\text{-Nau5Ac(2}\rightarrow\text{3)}\beta\text{-Galp1}\rightarrow\text{4}\beta\text{-GlcPNAc1}\rightarrow\text{3}\beta\text{-Galp1}\rightarrow\text{4}\beta\text{-GlcP1}$
 R2 = $\alpha\text{-GlcP}$
 R3 = H
 R4 = Ac (60%)
- L6
 R1 = $\beta\text{-GlcPNAc1}\rightarrow\text{3}\beta\text{-Galp}$
 R2 = H
 R3 = H
 R4 = Ac
 R5 = 7-PEA
- L8
 R1 = $\beta\text{-Galp}$
 R2 = 3-PEA
 R3 = H
 R4 = H

Figura 2A: estructuras de LOS de cepas de *N.meningitidis* L3

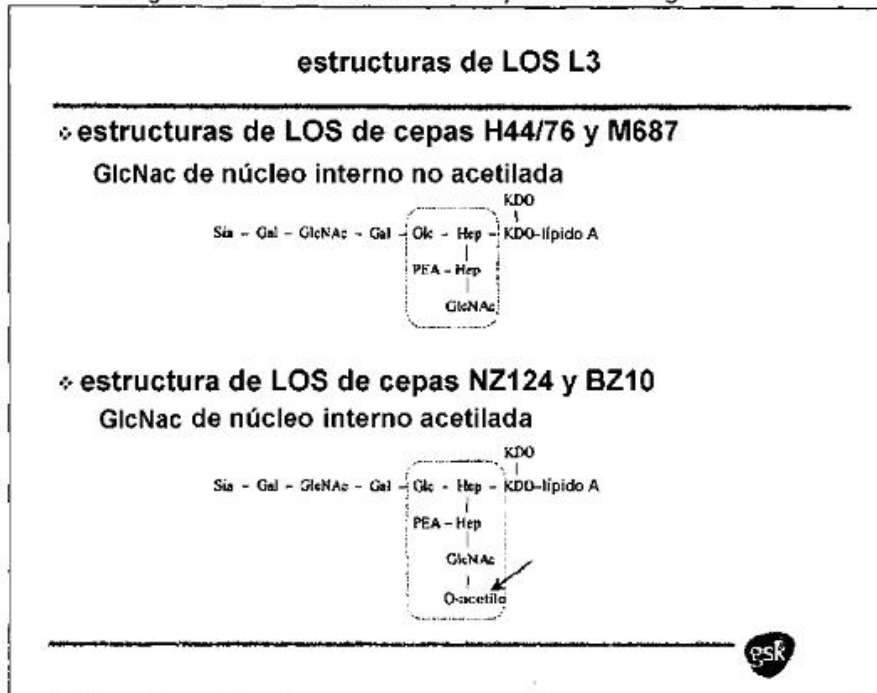


Figura 2B: estructuras de LOS comunes de diversos inmunotipos de *N.meningitidis*

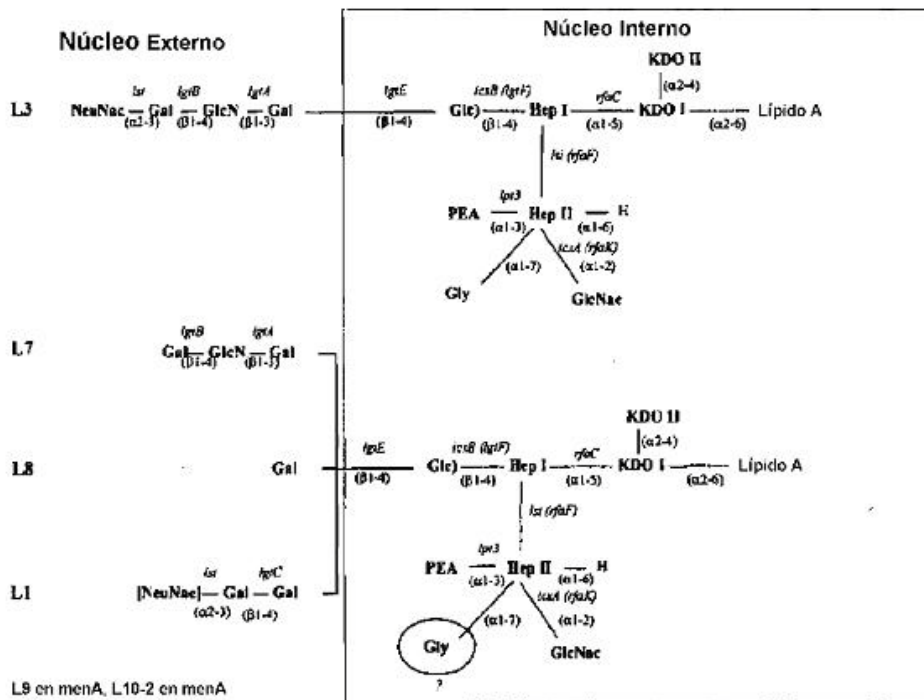


Figura 2B (continuación)

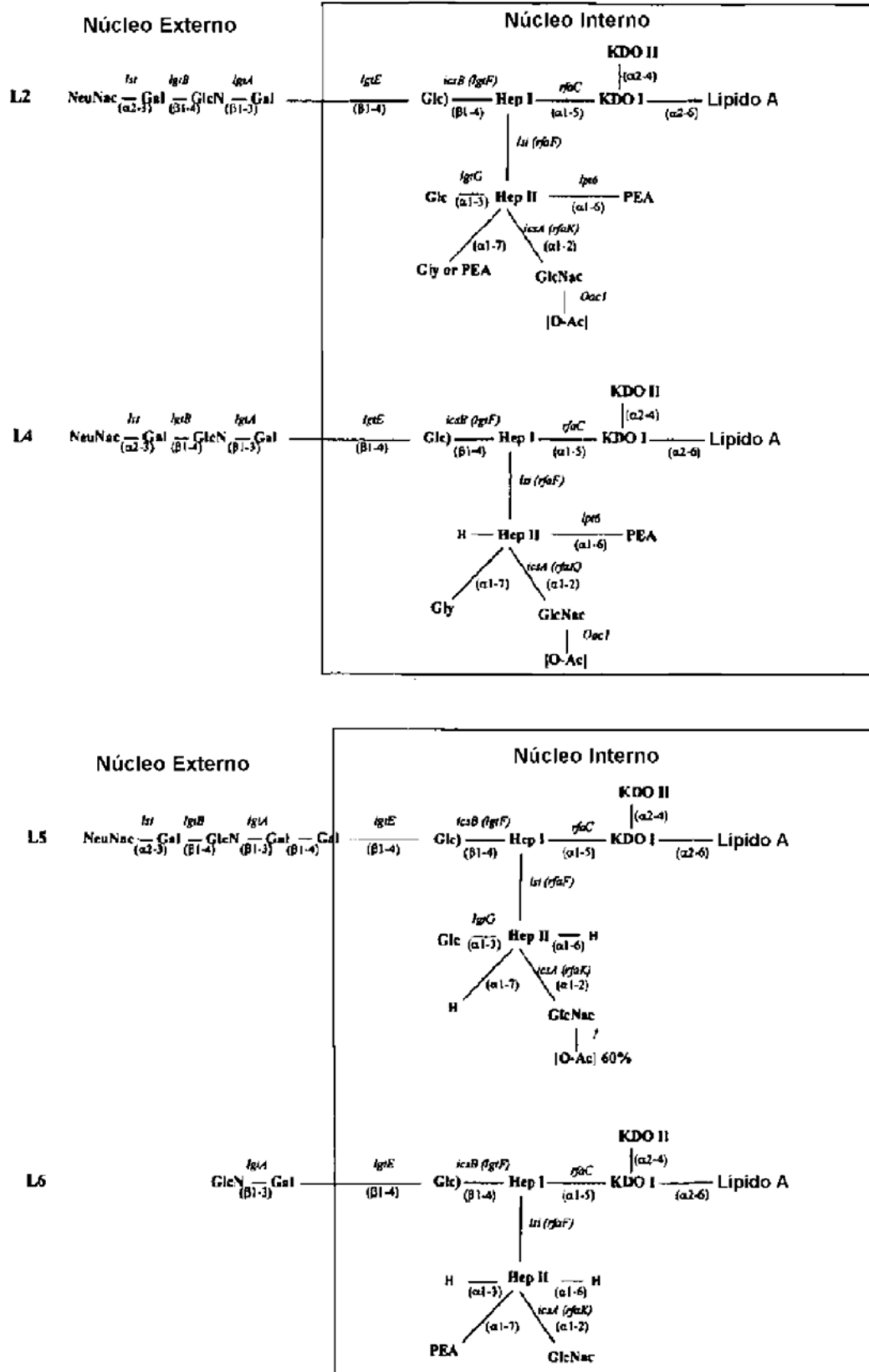


Figura 3A: Gen de O-acetilación de LOS de *N. meningitidis* NMA 2202 de la cepa Z2491

atgcaagctgtccgatacagaccggaaattgacggatgcccggccgtcgcctgctatcgcgcatgatttccacctgaa
 taaccgctggctgccggaggaficctgggggtggacatttctttgcatctcaggattccicattaccggcaicatic
 ttctgaaatacagaacggttcttttcttccgggattttatacccgaggattaaagcggatttatcctcttatt
 gcggccgtgtcgcgtgcttcgggtgatggcctcicaaalcttcctttacgaaagattcaaccaaatgcggaaaaccgtgga
 gctttctgcggtttcttggtecaatattatctgggggttcagcaggggtattcggattgagtcggacgagaaccccg
 tactgcatactggcttttggcagtagaggaaacagtattaccctcgtatcctcttttctgataatttctgcacaaaa
 acaaaatcgcctacgggtgctgcgtaacatcagcatcatcctatttctgatttgcactgccacatcgttttggcaagcgg
 gttttataccgatatttcaaccaacccaataacttattaccttgcacactgaggtttccgagctgttggcagggtcgc
 tgcctggcggtttacgggcaaacgcaaaacggcagacggcacaacagcaaatgaaaacggcagttgcttccatcactctgc
 ttccggcgaattgctgctgcctgctgattgacaacaacacaaatccgtttatccgggaatgacctgctccttccctg
 cctgctgacggcactgcttaccggagtatgcaatcagggacacttccgacctcctgctggcaagccccatcgtat
 ttgctggcaaaatccttattccctataacctgtaccattggattttattgctttcggccattacattacaggcgcacaaa
 cagctcggactgctcctgctatcggcggggccgctgacggcggcggatttccctgttgagtattattgattgaaca
 gccgcttagaaaacggaaagatgacctcaaaaaggcattttctgctctatctcggcccgtccctgatactgtcgggt
 acaacctgtacgcaaGGGGatattgaaacaggaaacacctcgccectgcccggcgcgcccctgctgaggaaaatcat
 ttccggaaaaccgtcctgacctcggcgcactgcacgccggacacctcgggggtttctgattatgctggcagccggga
 aggggtgaaaagccaaaatcctgctcctcgtatcggaggtttggtttgggtagatgagaagctgagcacaacccggtat
 gtcgaaaataccgggatgaagtgaaaaagccgaagcgtttcattgccaattctatgattgaggatggcgggccag
 cccgtgccgagattgaagcgaatccttcaataaccgggttcccagcccgaatcagggaaaccgtcaaaaggatagc
 cgcctcaaacccgtctatgttttgcacaacacatcaatcagccgttccctgagggaggaaaaattgaaaagat
 ttgccgcaaaccaatctcggcccattcaggctatggcgcacatcggcaagagcaatcaggcgtctttgatttatt
 aaagatattcccaatgtgcatgggtggacgcacaaaatacctgcccaaaaacacggctcgaatataggccgctatct
 ttacggcgaccaagaccacctgacctatttctggttcttattataggggcgggaatttcacaaaacgaacgccttcta
 aatcttctgcgacggcgcattgcagtagcctg

Figura 3B: Gen de O-acetilación de LOS de N.meningitidis NMB 0285 de la cepa MC58

ggcggcgccgctgctggattcgggcaatgcccattcggggcggggccggggattatggaggcggcaacaaggggcg
 cgttgcaggggaagtcggtttgggtgggctgaacacggtttgcccacagcagaaacgaaiccgatcaggacatc
 gccttgcggttttcccgtttgccgaacgcaaggcgggtgttttccgctatcccaagcatatgctgtatgcccggcgg
 ctccgggacgctgggacgaattgttgaaiictgacctgtgctgacgagggcaaaagtgcgccgctccgantgtttgg
 tcggaaaaggcgttttggctgggcttggcggagtgataaacgagcagcttttggcggcggctgattccgaaggggcg
 gctctttgttgcatacggacgatgaagacgaaatcgttgcgtatctgctggaacacgggcttcaagcagcagc
 tctgagagtgatgataaaitgcaaaccaatgaatgttggatgcttccgaacagcagcggaaatgatcaacc
 catcgcctcgtttccctttagaaggcgtatgcccacccgttgaagcattgcccggatttttccgaatcaggcc
 tgaatgaaggcggcgctcaaaagtcgaatgaatcggctcgaagcccgcggcggagccgaagatgcccgaagtgcggcc
 ttcatgctccgaaacgcttccgaaatcagacgggtgatgaaaactttcattggaagcggcggcggcgaagccat
 cgaagccaccaccaatcagcagatgcaaaaccatcgaatattgctgaaaaaacgttttccgaagtgcggaaagtcggc
 ccgtgagtgatgtaicccactcgcctgcaccagcgaagacatcaacaacctgcccacgcttaatgctgcaagaaagc
 cgtgaggcgttttctgcccgaagcgtggcgaatcagcaaaaactgaccgctatgcccagcagccttgcggcgtccc
 gatgatgagccgacccacggccagcccggcggaccactttggcgaagaaaccgcaatgctgttaccgctg
 aagccagtttaaaaactgcaagcgaaggttctcggcaaaatcaacggcggctggcaactacaacggccatag
 gtcgctatcctgatgtagattgggaaaccactgcccgaactcgtcgaatcagcctcggctgaccttcaacccta
 caccatcgaatcgaaccgacgactatagcgggaattctcgaacccctcagccgcatcaacagattctcactgact
 ttaaccgagcgtttgggttatatttcttgggttacttcaacaacaaagtcaaaagcaggcgaagtcgggttctccacc
 atgcccgcacaaagtcaccccactgactttgaaaactcggaggcgaacctcggatggcaaacgctattggcgtttt
 gtcgaaaaactgcccgaattcggctggcagcggacactgacgacagcaccgtattgccaataggcgtaggcgtgg
 gctatgcccgtattgggttccgcccaccctgcccggctgaaacagctcgaacccaaccccggcggctgcccggat
 ttggatgccactggggagctgctcggcggccgatcaaacctgtaatcggcgttacgggtgcccgaatccttacgaaa
 actgaaagacctgacgcccggcgaagcggcagcagcccgaagtctgaaaggdttatcggattcggaaatccccg
 ccgaaagcgaagcgaaitgctgagctgaccccggcgtgattggtggcaagcgtgaagcgtggcgaacggattgga
 gcttactgaaaccgatgccgtcgaacggcgttcaagcggcatttttaagataacgggacatacggggcgatatt
 ATGCAAGCTGTCCGATACAGACCGGAAATTGACGGATTGCGGGCCGTGCGCGTCTATCC
 GTCATGATTTTCCACCTGAA
 TAACCGCTGGCTGCCCGGAGGATTCTGGGGGTGGACATTTTCTTTGTTCATCTCAGGATTC
 CTCATTACCGGCATCATT
 TTTCTGAAATACAGAACGGTTCFTTTTCTTTCCGGGATTTTATACCCGCAGGATTAAGCGG
 ATTTATCCTGCCTTTATT
 GCGGCCGTGTCGCTGGCTTCGGTGATTGCCTCTCAAATCTTCCTTTACGAAGATTCAACC
 AAATGCGGAAAACCGTGA
 GCTTCTGCGGTTTTCTTGTCCAATATTTAATCTGGGGTTTCAGCAGGGGATTTTCGATTTGA
 GTGCCGACGAGAACCCCG
 TACTGCATATCTGGTCTTTGGCAGTAGAGGAACAGTATTACCTCCTGTATCCCCTTTTGCTG
 ATATTTTGTGCAAAAAA
 ACCAAATCGCTACGGGTGCTGCGTAACATCAGCATCATCCTGTTTTTGATTTTACTGCTC
 ATCGTTTTTGCCAAGCGG
 GTTTATACCGACATCCTCAACCAACCAATACTTATTACCTTTGACACTGAGGTTTCCCG
 AGCTGTTGGCAGGTTTCG
 TGCTGGCGGTTTACGGGCAACCGCAAACCGGCAGACGGCAAACAGCAAATGGAAAACGGC
 AGTTGCTTTCACTACTG
 TTCGGCGCATTTGCTTGCCTGCCTGTTCTGTGATTGACAAACACAATCCGTTTATCCCGGAA
 TGACCCTGCTCCTTCCCTG
 CCTGCTGACGGCACTGCTTATCCGGAGTATGCAATACGGGACACTTCCGACCCGCATCCTG
 TCGGCAAGCCCCATCGTAT
 TTGTCGGCAAAAATCTCTTATTCCCTATACCTGTACCAATTGGATTTTTATTGCTTTGCCCCAT
 TACATTACAGGGCAGAAA
 CAGCTCGGACTGCCTGCCGTATCGGCGGTTGCCGCTTGACGGCCGGATTTTCCCTGTTGA
 GTTATTAATTTGATTGAACA
 GCCGCTTAGAAAACGGAAAGATGACCTTCAAAAAGGCATTTTTCTGCCTCTATCTCGCCCCG
 TCCCTGATACTTGTCCGTT
 ACAACCTGTACGCAAGGGGGGATATTGAAAACAGGAACACCTCCGCCCGTTGCCCGGCGCG
 CCCCTTGCTGCGGAAAATCA

Figura 3B (continuación)

TTTTCCGGAACCGTCCTGACCTCGGGCGACTCGCACGCCGGACACCTGAGGGGGTTTCTG
 GATTATGTCGGCAGCCGGG
 AAGGGTGGAAAGCCAAAATCCTGTCCCTCGATTCCGGAGTGTTTGGTTTGGGTAGATGAGA
 AGCTGGCAGACAACCCGTTA
 TGTCGAAAAATACCGGGATGAAGTTGAAAAAGCCGAAGCCGTTTTCAATGCCCAATTCTATG
 ATTTGAGGATGGGCGGCCA
 GCCTGTGCCGAGATTTGAAGCGCAATCCTTCCTAATACCCGGGTCCCAGCCCGATTGAGG
 GAAACCGTCAAAAGGATAG
 CCGCCGTCAAACCCGTCTATGTTTTTGCAAACAACACATCAATCAGCCGTTCCGCCCTGAG
 GGAGGAAAAATTGAAAAGA
 TTTGCCGCAAACCAATATCTCCGCCCCATTGAGGCTATGGGCGACATCGGCAAGAGCAATC
 AGGCGGTCTTTGATTTGAT
 TAAAGATATCCCAATGTGCATTGGGTGGACGCACAAAAATACCTGCCCAAAAACACGGT
 CGAAATATACGGCCGCTATC
 TTTACGGCGACCAAGACCACCTGACCTATTTCGGTTCCTTATTATATGGGGCGGGAATTCCA
 CAAACACGAACGCCTGCTT
 AAATCTTCCCACGGCGCGCATGTCAGTAGcctgcctctgtcggatattgcctttggcagcctatgccgctgtttgcc
 gttcggggcgccggcctttatagtgattaaacaaaatcaggacaaggcgacgaagccgcagacagtacaaaatagtagcgg
 aaccgaticacttggtgcttcagcaecttagagaatcgctcctttgagcgaaggcgaggcaacgcctactggttttg
 taaicactafatthtgcggtttgagccgggggicgggaataaccgthtttagatgatttccctcccggctgtgca
 tcaaaaccccaattgcctttccaaactctccaccagattgtcatccagttcaaaagcctgcgacaggcggcgagggaaga
 cggthtcttcggcagacaatcggcacagaccaacctgcccgcagataggcctccggcccaacgcctcatcgttggc
 acggcgccggcgatgcttccgatccttgcgggaaggcggatccggcgccgagccatgcggcagttcggggctgtgccc
 gcttccgttcgatagccggcgttcggcctcctatcatccgctcgaagcggcgccggctatcatggtgcgcaata
 cggtagcggctgtatgthtccagttctccggcaggttggaatcgctttgttacgggtgcccgcccttgtttg
 tggcacatctgatagcccggtaggcgaggttagccaaagcggcgctcgaaccgatttgggtatggthtgcggtttt
 accgtcagcagcatggagcgcacccggcaaccagcgcgccctccgccgaatgaattgagcggcctgtcgggaatggt
 tgccttttttgaaccgtgcttaagacttggtgagcagtcgggtaaaagtcatgaattttcctttcgttgcgggaa
 gggcggtatgthtaccctatccttttaaacggcggcaggccggccaataatgthtggcgtaccgctgtgtttgalgcg
 gttgtcaggatggttacggcgccgtagcttctgctgggtgcgatgaggcggccgacggcctggatgagttgatccgg
 ctccggggcagggtgattcgtatgaaggggttgcggccgcctgcttccagcgggtttgggtttttcgtgggggtg
 tcggcagtcgggaagggaagttgctgatgacttgcacgagccggctccggggcaggtcagctcctcggcaaaact
 gtcgagtcgaagatgatgctgctttgcttctctatggcccgglggtgttttcaggaggacggcctttggglaatt
 cgcctgtacgagcaagagcggcaggtagtctccggcgaggcgcagggcgacatcctgcafttgtttgcgcgaggaaaac
 aagacgagcgtgcccgatggcttgggtgggcgaaataagctgggcagccatcgatgacggcggcggtgtgggctcggg
 gctttggggcgtggcgtataggggggatgtaggttccctgttttcaaagtcaaagggcctttgaggcggaggg
 tgggtgttcgggcagccattgagcccgggttggcgcagcatcaggtgaagtggccaaggattgaggggtggcggaa
 gtcaataccgcgctcggcagccgccacagcgtgttgcaaggtgggatgctgctgatgggctggcgttgaat
 gtagcgtttgtcgtcggcggcggggtatccatttgcacaacggttctcaccctcaggggggacagtgagagca
 aatcccaaacgcgctgattgttcgatacgggcgataaaaagaccgaactcgtggtcaggcggctcaggagcgcggc
 tccgttcttttcggcggtgctggcagaaagcgcctgttcagccgataacgtgtttgagcaggctgcgcgagcaat
 ggccgtattggaacgggtgttgcaggcc

Figura 3C: Gen de O-acetilación de LOS de N.meningitidis de la cepa 760676

tcgacctgacccgacagcaccgtcttacgcaatatggcggtggcggtgggctatgccgtgtgggcttggcccccacct
 gcgcggtcgaacaagctgaacccaaccctgccgccttgcgcccgaattggatgccacttggagctgctcgcgagc
 cgattcaaacgctgatgctgcttacggcggtggccaatccttacgaaaagctcaaagaccigacgcgaggcaaaggcggc
 attaccccgaagtgctgaaaagcttcacggatcgttggaaatccggcagaagccaaagcaaatgcttgagctgac
 tctgcactgtatgtggcaaggctgaagcgttggcgaaacggatttgagcgttactgaaaccgatccgctgacgc
 gcgttcagacggcaatttaagataaacggacatacggggcgatattATGCAAGCTGTCCGATACAGGCCTGAAATTG
 ACGGATTGCGGGCCGTTGCCGTGCTATCCGTCATTATTTCCACCTGAATAACCGCTGGCT
 GCCCGGAGGGTTTTTGGGGGTGGACATTTTCTTTGTCACTCTCGGGATTCTCATTACCGGC
 ATCATTCTTTCTGAAATACAGAACGGTTCTTTTTCTTT
 CCGGGATTTTTATACCCGCAAGGATTAAGCGGATTTATCCTGCTTTTATCGCGGCCGTGTCTG
 CTGGCTTCGGTGATTGCCTCTCAAATCTTCCTTACGAAGATTTCAACCAAATGCGGAAAA
 CCGTGAGCTTTCTGCGTTTTCTTGTCCAATATTTATCTGGGGTTTCAGCAGGGGTATTTT
 GATTTGAGTGCCGACGAGAACCCCGTACTGCATATCTGGTCTTTGGCGGTAGAGGAAACAGT
 ATTACCTCCTGTATCCTCTTTTGCTGATATTTTGTGCAAAAAACCAAATCGCTACGGGTG
 CTGCGTAACATCAGCATCATCCTATTTCTGATTTTACTGCCACATCGTTTTTGGCAAGCAG
 GTTTTATACCGACATCCTCAACCAACCAATACTTATTACCTTTGACACTGAGGTTTCCCG
 AGCTGTTGGCAGGTTTCGCTGCTGGCGGTTTACGGGCAAACGCAAACGGCAGACGGCAA
 CAGCAAAGCGGAAAACGGCAGTTGCTTTCACTCTGCTTCGGCGCATTGCTTGCCTGCCT
 GTTCGIGATTGACAAACACAATCCGTTTATCCCGGGAATGACCCTGCTCCTTCCCTGCCTG
 CTGACGGCACTGCTTATCCGGAGTATGCAATACGGGACACTTCCGACCCGCATCCTGTCTGG
 CAAGCCCCATCGTATTTGTGCGCAAATCTCTTATTCCTTATACCTGTACCAATTGGATTTTT
 ATFGCCTTCGCCCATTACATTACAGGCGACAAACAGCTCGGACTGCCTGCCGTATCGGCGG
 TTGCCGATTGACGGCCGGATTTTCCCTGTTGAGCTATTATTTGATTGAACAGCCGCTTAG
 AAAACGGAAGATGACCTTCAAAAAGGCATTTTTCTGCCTCTATCTCGCCCCGTCCTGTATA
 CTTGTGCGTTACAACCTGTACGCAAGGGGATATTGAAACAGGAAACACCTCCGCCCGTTG
 CCGGCGCGCCCTTGTGCGGAAAATCATTTTCCGGAAACCGTCTGTACCCCTCGGCGACTC
 GCACGCCGGACACCTGCGGGGTTTTCTGGATTATGTGCGCAGCCGGGAAGGGTGGAAAGC
 CAAAATCCTGTCCCTCGATTCCGAGTGTGTTGGTTTGGGTGGATACGACACTGGCAGACAAC
 CCGTTATGTGCAAAATACCCGGATGAAGTTGAAAAAGCCGAAGCCGTTTTTCATTGCCCAAT
 TCTATGATTTGAGGATGGGCGGCCAGCCCGTGCCGAGATTTGAAGCGCAATCCTTCTAAT
 ACCCGGGTTCCAAGCCCGATTACGGGAAACCGTCAAAGGATAGCCGCCGTCAAACCCGT
 CTATGTTTTTGCAACAACACATCAATCAGCCGTTCCGCCCTGAGGGAGGAAAAATTGAA
 AGATTTGCCGAAACCAATATCTCCGCCCATTC
 GGCTATGGGCGACATCGGCAAGAGCAATCAGGCGGTCTTTGATTTGGTTAAAGATATCCCC
 AATGTGCATTGGGTGGACGCACAGAAATACCTGCCTAAAAACAAGGTCGAAATACACGGA
 CGCTATCTTACGGCGACCAAGACCACCTGACCTATTTCCGTTCTTATATATGGGGCGGGA
 ATTTACAAACACGAACGCCTGCTTAAATCTTCCCGCGGCGGCATTGCAGTAGcctgccttctt
 gtcggatattgctttggcagcctatgccgctgttgccttcggggcgccggcctttatagtggattaaacaaaatcaggacaaggcagcgaagccgc
 agacagtaacaatagtacggaaccgattcacttgggttcagcaaccttagagaatcgttctctttgagctaaggcgaggcaacgcgactggttttgi
 taatccactatattttgctgtttgagggcg
 gggtcggaaataaccggtttttgatgatttccctccctggctgtgtcatcaaaaacccaattgctttcacaactctccaccagattgtcatccagttcaag
 cctgctgacaggcggggcaggaagacgggttttccgcgacaatcggcacagaccaacttgcgcccagataggcctcgcgccaacgcctca
 tcttgcgacggcgggtggcgatgtcccgatcttgcgggcaggcggtattcggcgagccatgcccagttcggggtctgtgccgtttct
 gttcgatagtcggcggtcctcgtctatcatgccgtctgaagcggcgccgctatcagtgctgcaatacgggtgcggctgtatgntcncagtc

Figura 3D: Gen de O-acetilación de LOS de L3 N.meningitidis B de la cepa NZ124

tcgacctgaccgacagcaccgctctacgcaatatgggctggggcgtgggctalgccgtgtgggttcgcccacacctg
cgcggctgaaacaagctcgaaccaaccctgccgcgcttccgccgatttggatgccactgggaactgctcggagcc
gattcaaacgigatgcgccgttacgggtgcgcaaaccttacgaaaaactgaaagacctgacgcgcggcaaggcgca
tiacgcccgaagtgtgaaaggctttatcggatcgtgaaatccccgtcgaagc caaagcaaaattgctgagctgacc
cccgcactgtagtgggcaaggctgaaagcgtggcgaaacggattggoggttactgaaaccgatgcgctgaaagcg
cgttcagacggcattttaagataacgggacatacggggcgatattATGCAAGCTGTCCGATACAGGCCTGAAATTGA
CGGATTGCGGGCCGTTGCCGTGCTATCCGTCAATTATTTCCACCTGAAATAACCGCTGGCTG
CCCGGAGGGTTTTTGGGGGTGGACATTTTCTTTGTCATCTCGGGATTCTCATTACCGCA
TCATTTCTTTCTGAAATACAGAACGGTTCTTTTTCTTTCC
GGGATTTTTATACCCGCAGGATTAAGCGGATTTACCTGCCTTTATTGCGGCCGTGTCGCT
GGCTTCGGTGATTGCCTCTCAAATCTTCTTTACGAAGATTTCAACCAAATGCGGAAAACC
GTGGAGTTTTCTGCGGTTTTCTGTCCAATATTTATCTGGGGTTTTCAGCAGGGGTATTTCCA
TTTGAGTGCCGACGAGAACCCCGTACTGCATATCTGGTCTTTGGCAGTAGAGGAACAGTAT
TACCTCCTGTATCCTCTTTGCTGATATTTTGTGCAAAAAAACAATAATCGCTACGGGTGCT
GCGTAACATCAGCATCATCCTATTTCTGATTTTACTGCCACATCGTTTTTCCAAGCGGGT
TTTATACCGATATTTCAACCAACCAATACTTATTACCTTTGACACTGAGGTTTTCCCGAG
CTGTTGGCAGGTTGCTGCTGGCGGTTACGGGCAAACGCAAAACGGCAGACGGCAAACA
GCAAATGGAAAACGGCAGTTGCTTTTCACTCTGCTTCGGCGCATTGCTTGCCTGCCTGT
TCGTGATTGACAAACACAATCCGTTTATCCCGGAATGACCCTGCTCCTTCCCTGCCTGCT
GACGGCGCTGCTTATCCGGAGTATGCAATACGGGACACTTCCGACCCGCA TCCTGTCCGCA
AGCCCCATCGTATTTGTCCGCAAAATCTCTTATTCCCTATACCTGT
ACCATTTGATTTTTATTGCTTTCGCCATTACATTACAGGCGACAAACAGCTCGGACTGCC
TGCCGTATCGGCGGTGCGCGGTTGACGGCCGGATTTCCCTGTTGAGTTATTATTTGATTG
AACAGCCGCTTAGAAAACGGAAAGATGACCTTCAAAAAGGCATTTTTCTGCCTCTATCTGC
CCCGTCCCTGATACTTGTGCGTTACAACCTGTACGCAAGGGGGATATTGAAACAGGAACAC
CTCCGCCCGTTGCCCGGCGCGCCCTTGTGCGGAAAATCATTTTCCGGAAACCGTCTGA
CCCTCGGCGACTCGCACGCCGGACACCTGCGGGGGTTTTCTGGATTAATGTCGGCAGCCGGGA
AGGGTGGAAAAGCCAAAATCCTGTCCCTCGATTCCGGAGTGTGTTGGTTTGGGTAGATGAGAA
GCTGGCAGACaACCCGTTATGTCGAAAATACCGGGATGAAGTTGAAAAGCCGAAGCCGT
TTTCATTGCCCAATTCTATGATTTGAGGATGGGCGGCCAGCCCGTGCCGAGATTTGAAGCG
CAATCCTTCTAATACCCGGGTTCCAAGCCCGATTACAGGAAACCGTCAAAGGATAGCCG
CCGTCAAACCCGTCTATGTTTTGCAAACAACACATCAATCAGCCGTTCCGCCCTGAGGGA
GGAAAATTTGAAAAGATTTGCCGCAAACCAATATCTCCGCCCATTCAGGCTATGGGCGAC
ATCGGCAAGAGCAATCAGGCGGTCTTTGATTTGATTAAGATAATCCCAATGTGCATTGGG
TGGACGCACAAAAATACCTGCCCAAAAACACGGTCGAAAATATACGGCCGCTATCTTTACG
GCGACCAAGACCACCTGACCTATTTCCG
TTCTTATTATATGGGGCGGGAATTTCACAAACACGAACGCCTGCTTAAATCTTCTCGCGAC
GGCGCATTTGCAGTAGcctgccttccgctccgatacgtttgtgccgcggttgccttggggcggcgcggttttatttccctccctgc
gggagggaatttgaatcaaaccccaattgccttccaagtttccaccagattgcatccagttc caaagcctgcgacagggcgagggaagacg
gttcttcccgacaaatcggcacataccagcttccgccagataggcctccgcccaagcctcatcgttccgacggcgcgagatgcttc
gatgcttccggcgaggcgglattcggcgcgagccatgcagcagttcgg
ggtctgtgccgttctgttcgatagtcggcggttcgctcgtatcagcgtcgaagcggcggtgctatcatgttcgcaatacgggtgcggt
glatgttctccggttccggcaggttgaaatcgtttgtttacgggttccaa

Figura 4A

OS de núcleo interno de LOS 6275 (EN-)

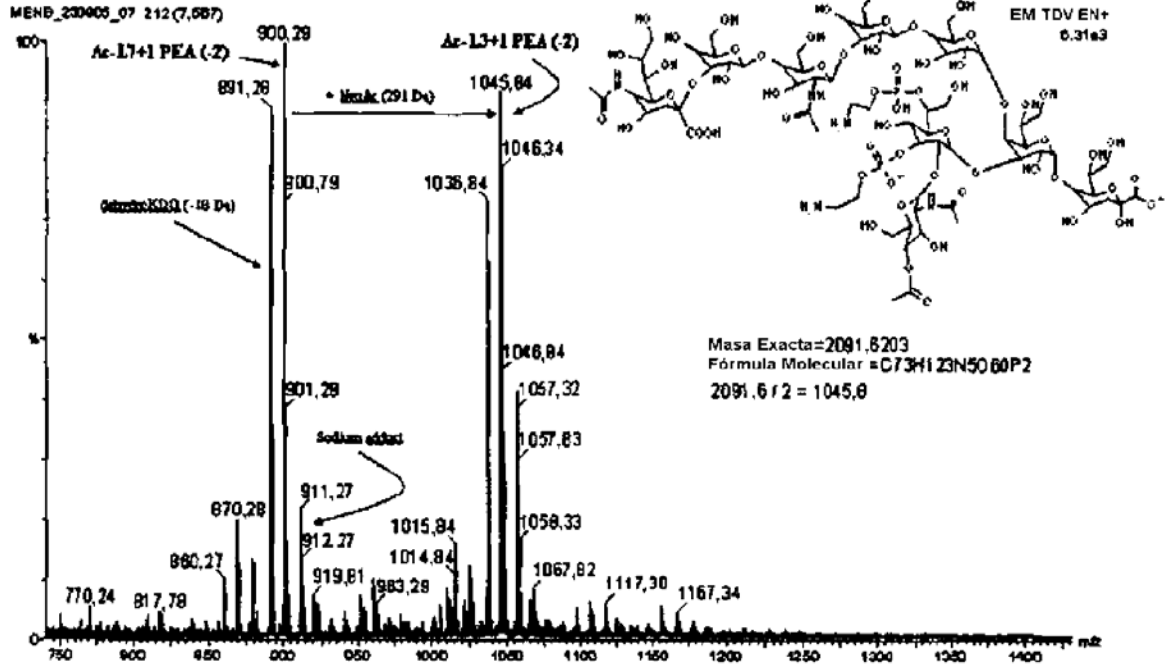


Figura 4B

Os de Núcleo Interno de LOS 6275 (EM/EM EN+ m/z 1803,6)

MENB_200008_02 102(8,006)

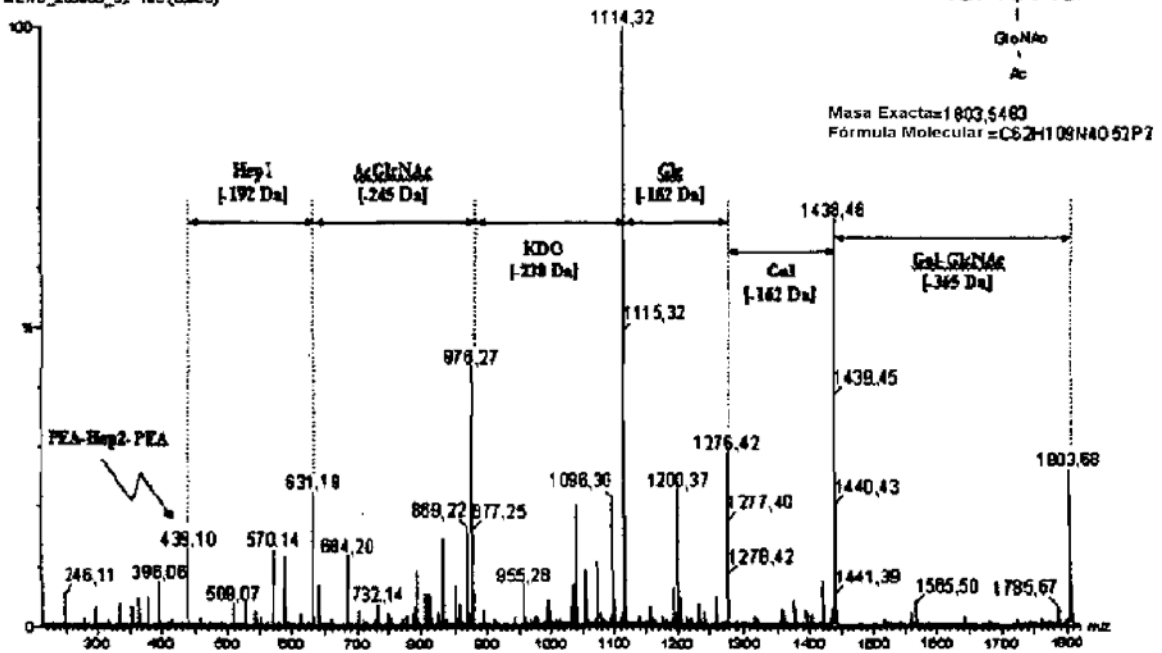


Figura 4C

OS de C11

MEND_170106_05 82 (3.285) Sm (Mn, 2x3.00); Cm ((132:114+126:139+174:183+192:353))

2.22e4

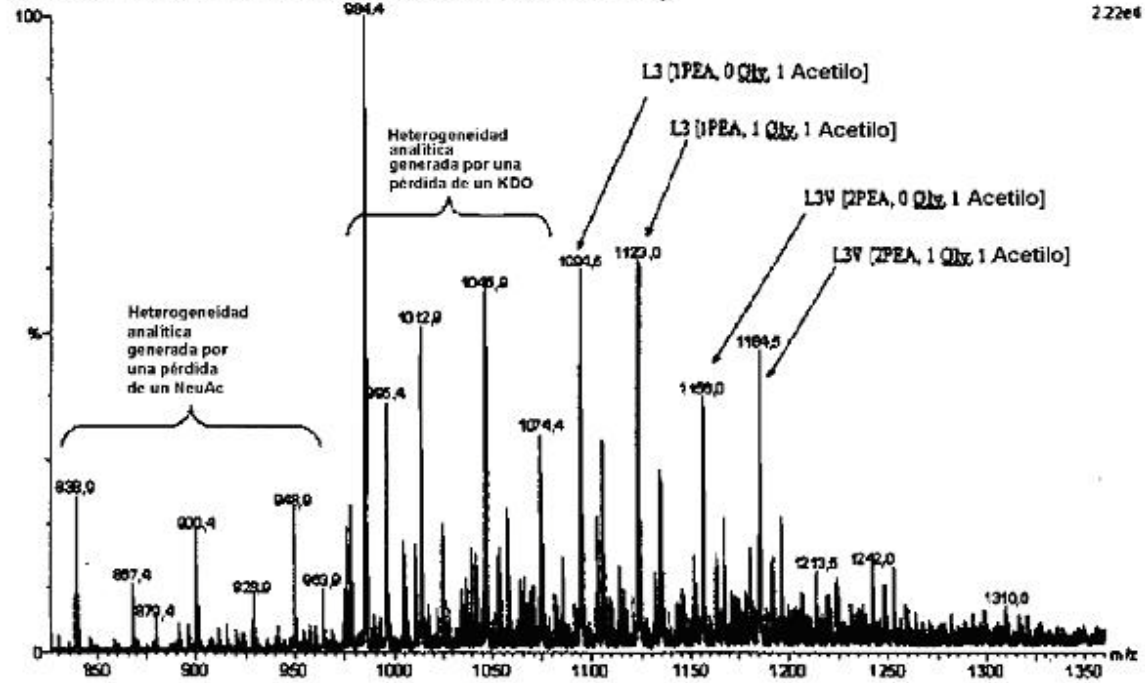


Figura 5

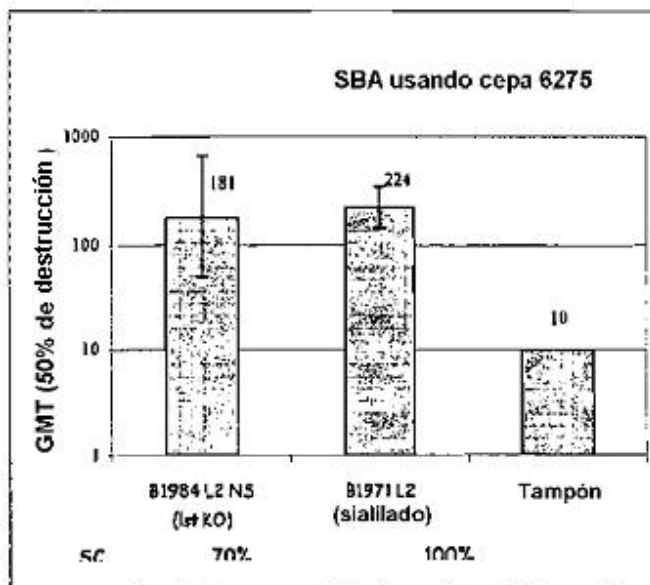


Figura 6

