

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 923**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2004 E 04791703 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1670506**

54 Título: **Vacunas líquidas para múltiples serogrupos meningocócicos**

30 Prioridad:

02.10.2003 GB 0323102

28.05.2004 GB 0412052

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.03.2013

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel , CH

72 Inventor/es:

CONTORNI, MARIO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 397 923 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 líquidas para múltiples serogrupos meningocócicos

Campo técnico

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

Antecedentes de la técnica

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

15 Basándose en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado diversos serogrupos de *N. meningitidis*, incluyendo A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y y Z. El serogrupo A es el patógeno implicado con mayor frecuencia en enfermedad epidémica en el África sub-sahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la amplia mayoría de casos en los Estados Unidos y en la mayoría de los países desarrollados. Los serogrupos W135 y Y son responsables del resto de los casos en los Estados Unidos y países desarrollados. Aunque el polisacárido capsular es un inmunógeno protector eficaz, cada serogrupo requiere un antígeno sacárido separado, y este enfoque no es adecuado para inmunizar contra el serogrupo B. Por lo tanto, el reciente éxito con vacunas de sacáridos conjugados contra serogrupo C (Menjugate™ [2], Meningitec™ y NeisVac-C™) no ha tenido ningún impacto en la enfermedad provocada por los serogrupos A, B, W135 o Y; por el contrario, presentan una presión selectiva hacia la aparición de estos serogrupos como causas principales de enfermedad meningocócica.

20 Se ha conocido durante muchos años una vacuna tetravalente inyectable de polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, Y y W135 [3,4] y está aprobada para su uso humano. Los polisacáridos en esta vacuna no están conjugados y están presentes a una relación en peso de 1:1:1:1 [5], con 50 µg de cada polisacárido purificado. Aunque es eficaz en adolescentes y adultos, induce una escasa respuesta inmune y corta duración de la protección y no puede usarse en niños [por ejemplo, ref. 6]. Además, las vacunas padecen la desventaja de requerir reconstitución a partir de formas liofilizadas en el momento del uso.

30 El documento WO02/058737 describe una composición inmunológica que comprende dos o más conjugados de proteína-polisacárido de polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* serogrupos A, C, W135 y Y. También se describen la formulación de vacuna y modos de administración de las composiciones, y se analizan los problemas asociados con la escasa inmunogenicidad de los polisacáridos del serogrupo B.

35 Para el serogrupo B, ha sido difícil encontrar una vacuna. Se han ensayado vacunas basadas en vesículas de membrana externa [por ejemplo, ref. 7], pero la protección se restringe típicamente a la cepa usada para realizar la vacuna.

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

Divulgación de la invención

40 La invención satisface todas estas diversas necesidades, y se basa en el hallazgo de que la eficacia de un conjugado de serogrupo W135 se potencia mediante la adición de antígenos proteicos derivados de una cepa del serogrupo B.

45 Por lo tanto la invención proporciona una composición inmunógena acuosa que, después de su administración a un sujeto, es capaz de inducir una respuesta inmune que es bactericida contra los serogrupos B, C, W135 y Y de *N. meningitidis*, comprendiendo la composición: (i) un antígeno sacárido capsular del serogrupo C conjugado; (ii) un antígeno sacárido capsular del serogrupo W135 conjugado; (iii) un antígeno sacárido capsular del serogrupo Y conjugado; y (iv) una proteína "NadA" en forma oligomérica, una proteína "741", una proteína "936", una proteína "953" y una proteína "287". La composición acuosa también puede inducir una respuesta inmune que es bactericida contra el serogrupo A de *N. meningitidis* y por lo tanto puede comprender además: (v) un antígeno sacárido capsular del serogrupo A conjugado.

50 Los antígenos sacáridos preferidos son oligosacáridos.

Serogrupos C, W135 y Y

Se han conocido durante muchos años técnicas para preparar polisacáridos capsulares a partir de meningococos, y

típicamente implican un procedimiento que comprende las etapas de precipitación de polisacáridos (por ejemplo, usando un detergente catiónico), fraccionamiento con etanol, extracción con fenol frío (para retirar proteínas) y ultracentrifugación (para retirar LPS) [por ejemplo, véase ref. 8].

5 Un procedimiento más preferido [9] implica precipitación de polisacáridos seguida de solubilización del polisacárido precipitado usando un alcohol inferior. La precipitación puede conseguirse usando un detergente catiónico tal como sales de tetrabutilamonio y cetiltrimetilamonio (por ejemplo, las sales de bromuro), o sales de bromuro de hexadimetrina y miristiltrimetilamonio. Se prefiere particularmente bromuro de cetiltrimetilamonio ("CTAB") [10]. La solubilización del material precipitado puede conseguirse usando un alcohol inferior tal como metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioles, etc., pero el etanol es particularmente adecuado para solubilizar complejos CTAB-polisacárido. Puede añadirse etanol al polisacárido precipitado para proporcionar una concentración de etanol final (basándose en el contenido total de etanol y agua) de entre 50% y 95%.

10 Después de la resolubilización, el polisacárido puede tratarse adicionalmente para retirar contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en las que incluso una contaminación menor no es aceptable (por ejemplo, para producción de vacuna humana). Esto típicamente implicará una o más etapas de filtración, por ejemplo puede usarse filtración de profundidad, filtración a través de carbono activado, filtración por tamaño y/o ultrafiltración.

20 Una vez filtrado para retirar los contaminantes, el polisacárido puede precipitarse para tratamiento y/o procesamiento adicional. Esto puede usarse convenientemente intercambiando cationes (por ejemplo, mediante la adición de sales de calcio o sodio).

Después de la purificación, los sacáridos capsulares se conjugan con proteínas portadoras como se describe posteriormente.

Se desvelan procedimientos adicionales y alternativos para purificación y conjugación de sacáridos meningocócicos en las referencias 11 y 12.

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

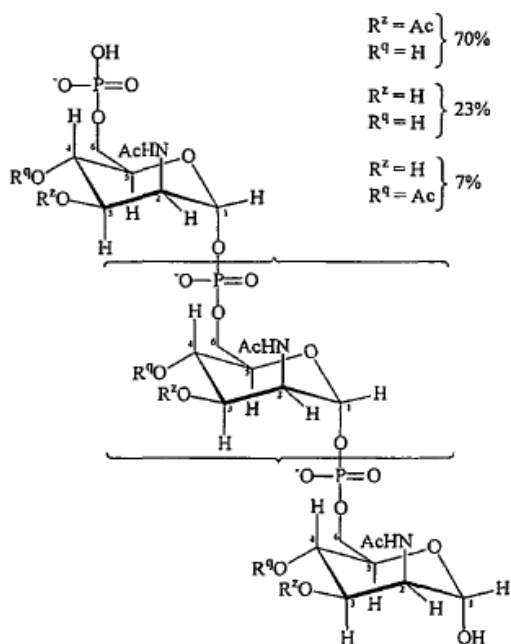
30 Uno o más de los antígenos sacáridos capsulares del serogrupo C, W135 y Y están O-acetilados. Cualquier hiperacetilación puede estar en posiciones específicas en el sacárido. Por ejemplo, la mayoría de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en las posiciones C-7 y C-8 de los restos de ácido siálico, pero aproximadamente el 15% de los aislados clínicos carecen de estos grupos de O-acetilo [15,16]. La acetilación no parece afectar a la eficacia protectora (por ejemplo, a diferencia del producto Menjugate™, el producto NeisVac-C™ usa un sacárido des-O-acetilado, pero ambas vacunas son eficaces). El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades de disacáridos de ácido siálico-galactosa. El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto que la unidad de repetición de disacáridos incluye glucosa en lugar de galactosa. Como los sacáridos del serogrupo C, los sacáridos MenW135 y MenY tienen O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico [17]. Cualquiera de dichas modificaciones químicas preferentemente tiene lugar antes de la conjugación, pero puede como alternativa o adicionalmente tener lugar durante la conjugación.

Los sacáridos de diferentes serogrupos se purifican preferentemente por separado, y pueden después combinarse, antes o después de la conjugación.

40 **Serogrupo A**

Las composiciones de la invención pueden incluir un antígeno sacárido capsular del serogrupo A conjugado. El sacárido puede purificarse y conjugarse de la misma manera para los serogrupos C, W135 y Y (véase anteriormente), aunque es estructuralmente diferente, mientras que las cápsulas de los serogrupos C, W135 y Y se basan en el ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico, NeuAc), la cápsula del serogrupo A se basa en N-acetil-manosamina, que es el precursor natural del ácido siálico. El sacárido del serogrupo A es particularmente susceptible a hidrólisis, y su inestabilidad en medio acuoso significa que (a) la inmunogenicidad de vacunas líquidas contra serogrupo A disminuye a lo largo del tiempo, y (b) el control de calidad es más difícil, debido a la liberación de productos de hidrólisis de sacáridos a la vacuna.

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



Los inventores han preparado un antígeno sacárido modificado que conserva la actividad inmunógena del sacárido de serogrupo A nativo pero que es mucho más estable en agua. Los grupos hidroxilo unidos en los carbonos 3 y 4 de las unidades monosacáridas se reemplazan por un grupo de bloqueo [ref. 18].

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

10 De forma similar, el número de grupos de bloqueo en una unidad monosacárida puede variar. Por ejemplo, el número de grupos de bloqueo en cualquier unidad monosacárida particular puede ser 1 o 2.

La unidad monosacárida terminal puede tener o no un grupo de bloqueo en lugar de su hidroxilo nativo. Se prefiere conservar un grupo hidroxilo anomérico libre en una unidad monosacárida terminal para proporcionar un apoyo para reacciones adicionales (por ejemplo, conjugación). Los grupos hidroxilo anoméricos pueden convertirse en grupos amino (-NH₂ o NH-E, en los que E es un grupo protector de nitrógeno) por aminación reductora (usando, por ejemplo, NaBH₃CN/NH₄Cl), y pueden después regenerarse después de que otros grupos hidroxilo se hayan convertido a grupos de bloqueo.

15 Los grupos de bloqueo para reemplazar grupos hidroxilo pueden ser accesibles directamente mediante una reacción de derivatización del grupo hidroxilo, es decir reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo con otro grupo. Son derivados adecuados de grupos hidroxilo que actúan como grupos de bloqueo, por ejemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (por ejemplo, silil éteres o alquil éteres) y acetales. Algunos ejemplos específicos de tales grupos de bloqueo son alilo, Alloc, bencilo, BOM, t-butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP, etc. Otros grupos de bloqueo que no son directamente accesibles y que reemplazan completamente el grupo hidroxilo incluyen alquilo C₁₋₁₂, alquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ - alquilo C₁₋₆, NR¹R² (R¹ y R² se definen en el siguiente párrafo), H, F, Cl, Br, CO₂H CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃, CCl₃, etc.

20 Los grupos de bloqueo preferidos son de la fórmula: -O-X-Y o -OR³ en las que: X es C(O), S(O) o SO₂; Y es alquilo C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ o arilo C₅₋₁₂ - alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales puede sustituirse opcionalmente con 1, 2 o 3 grupos seleccionados de forma independiente de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o Y es NR¹R²; R¹ y R² se seleccionan de forma independiente de H, alquilo C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ - alquilo C₁₋₆; o R¹ y R² pueden unirse para formar un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂; R³ es alquilo C₁₋₁₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, cada uno de los cuales puede sustituirse opcionalmente con 1, 2 o 3 grupos seleccionados de forma independiente de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃; o R³ es arilo C₅₋₁₂ o arilo C₅₋₁₂ - alquilo C₁₋₆, cada uno de los cuales puede sustituirse opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos seleccionados de forma independiente de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ o CCl₃. Cuando R³ es alquilo C₁₋₂ o cicloalquilo C₃₋₁₂, está sustituido típicamente con 1, 2 o 3 grupos como se ha definido anteriormente. Cuando R¹ y R² están unidos formando un grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂, se entiende que R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno forman un grupo heterocíclico saturado que contiene cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). El grupo heterocíclico puede contener 1 o 2 heteroátomos (tales como N, O o S)

distintos del átomo de nitrógeno. Son ejemplos de grupos heterocíclicos saturados pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, azetidinilo y aziridinilo C₃₋₁₂.

5 Pueden prepararse grupos de bloqueo -O-X-Y y -OR³ a partir de grupos -OH por procedimientos de derivatización convencionales, tales como reacción del grupo hidroxilo con un acil haluro, alquil haluro, sulfonyl haluro, etc. Por lo tanto, el átomo de oxígeno en -O-X-Y es preferentemente el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, mientras que el grupo -X-Y en -O-X-Y preferentemente reemplaza el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo.

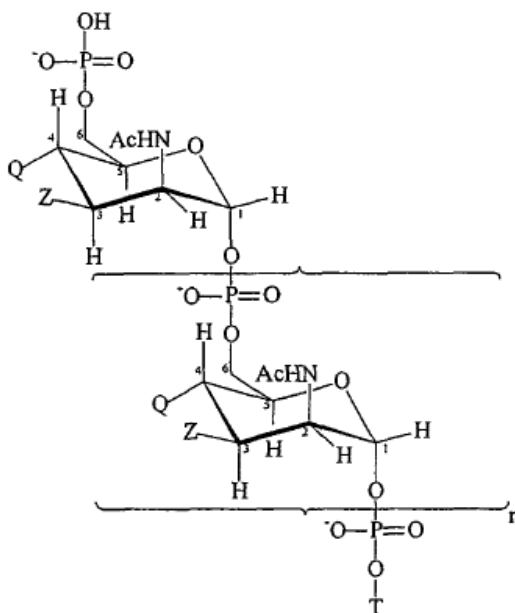
Como alternativa, los grupos de bloqueo pueden ser accesibles mediante una reacción de sustitución, tal como una sustitución de tipo Mitsunobu. Se conocen bien estos y otros procedimientos para preparar grupos de bloqueo a partir de grupos hidroxilo.

10 Más preferentemente, el grupo de bloqueo es -OC(O)CF₃ [19], o un grupo carbamato -OC(O)NR¹R², en el que R¹ y R² se seleccionan de forma independiente de alquilo C₁₋₆. Más preferentemente, R¹ y R² son ambos metilo, es decir el grupo de bloqueo es -OC(O)NMe₂. Los grupos de bloqueo de carbamato tienen un efecto estabilizador en el enlace glicosídico y pueden prepararse en condiciones suaves.

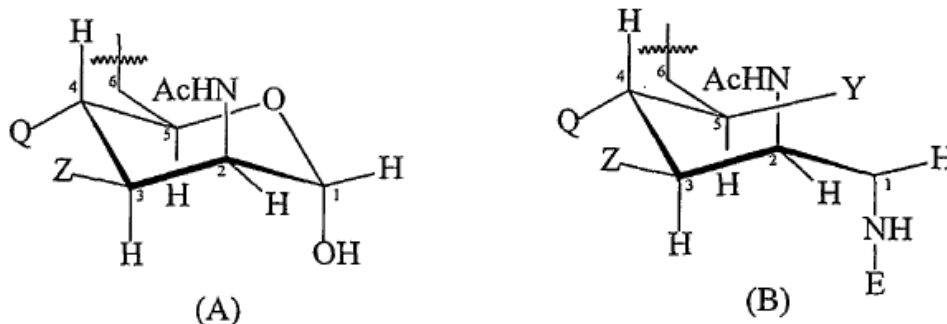
15 Los sacáridos MenA modificados preferidos contienen *n* unidades monosacáridas en las que al menos *h*% de las unidades monosacáridas no tienen grupos -OH en ambas posiciones 3 y 4. El valor de *h* es 24 o más (por ejemplo 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95,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

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

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



25 en la que
n es un número entero de 1 a 100 (preferentemente un número entero de 5 a 25, más preferentemente 15-25);
 T es de la fórmula (A) o (B):



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

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

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

E es H o un grupo protector de nitrógeno;

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

10 Cada uno de los $n + 2$ grupos Z pueden ser el mismo o diferentes entre sí. De forma similar, cada uno de los $n + 2$ grupos Q pueden ser iguales o diferentes entre sí. Todos los grupos Z pueden ser OH. Como alternativa, al menos el 10%, 20, 30%, 40%, 50% o 60% de los grupos Z pueden ser OAc. Preferentemente, aproximadamente el 70% de los grupos Z son OAc, siendo el resto de los grupos Z OH o grupos de bloqueo como se ha definido anteriormente. Al menos aproximadamente el 7% de los grupos Q son grupos de bloqueo. Preferentemente, al menos el 10%, 20%,
15 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso 100% de los grupos Q son grupos de bloqueo.

Son grupos de bloqueo preferidos los grupos aceptores de electrones. Sin desear quedar vinculado por la teoría, se cree que los enlaces glicosídicos son inestables a hidrólisis debido a la ayuda de un ataque nucleófilo intramolecular de un grupo hidroxilo sacárido en el enlace glicosídico (es decir, por formación de un intermedio cíclico). Cuanto mayor sea la nucleofilia del grupo hidroxilo, mayor será la tendencia de ataque nucleófilo intramolecular. Un grupo
20 de bloqueo aceptor de electrones tiene el efecto de deslocalizar el par aislado de oxígeno, reduciendo de este modo la nucleofilia del oxígeno y reduciendo la tendencia de ataque nucleófilo intramolecular.

Para proteger contra el serogrupo A, por lo tanto, las composiciones acuosas pueden incluir un sacárido modificado MenA como se ha definido anteriormente.

25 Las composiciones preferidas de la invención pueden almacenarse durante 28 días a 37 °C y, después de ese período, menos de f % de la cantidad total inicial de sacárido MenA conjugado se desconjugará cuando f sea 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o menor.

Conjugación covalente

30 Los sacáridos capsulares en composiciones de la invención habitualmente se conjugarán con proteína o proteínas portadoras. En general, la conjugación potencia la inmunogenicidad de los sacáridos porque los convierte de antígenos independientes de T a antígenos dependientes de T, permitiendo de este modo la sensibilización para memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas y es una técnica bien conocida [por ejemplo revisada en ref. 20 a 29].

35 Son proteínas portadoras preferidas toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoide diftérico o toxoide del tétanos, o el mutante de toxina diftérica CRM₁₉₇ [30-32]. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis*. [33], péptidos sintéticos [34,35], proteínas de choque térmico [36,37], proteínas de pertussis [38,39], citocinas [40], linfocinas [40], hormonas [40], factores de crecimiento [40], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de linfocitos T CD4⁺ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos [41] tales como la proteína N19 [42], proteína D de *H. influenzae* [43,44], neumolisina [45], proteína de superficie neumocócica PspA [46], proteínas de captura de hierro [47], toxina A o B de *C. difficile* [48], toxinas bacterianas mutantes (por ejemplo, toxina del cólera "CT" o toxina lábil por calor de *E. coli* "LT"), tales como una CT con una sustitución en Glu-29 [49], etc. Son vehículos preferidos toxoide diftérico, toxoide del tétanos, proteína D de *H. influenzae* y particularmente CRM₁₉₇.

45 Dentro de una composición de la invención, es posible usar más de una proteína portadora por ejemplo para reducir el riesgo de supresión de vehículo. Por lo tanto pueden usarse diferentes proteínas portadoras para diferentes serogrupos, por ejemplo los sacáridos del serogrupo A podrían conjugarse con CRM₁₉₇ mientras que los sacáridos del serogrupo C podrían conjugarse con el toxoide del tétanos. También es posible usar más de una proteína portadora para un antígeno sacárido particular, por ejemplo los sacáridos del serogrupo A podrían estar en dos

grupos, con algunos conjugados con CRM₁₉₇ y otros conjugados con toxoide del tétanos. En general, sin embargo, se prefiere usar la misma proteína portadora para todos los serogrupos, siendo CRM₁₉₇ la elección preferida.

Una proteína portadora única podría aportar más de un antígeno sacárido [50]. Por ejemplo, una proteína portadora única podría tener conjugados con ella sacáridos de los serogrupos A y C. Para conseguir este objetivo, los sacáridos pueden mezclarse antes de la reacción de conjugación. En general, sin embargo, se prefiere tener conjugados separados para cada serogrupo.

Se prefieren conjugados con una relación sacárido:proteína (p/p) de entre 1:5 (es decir, proteína en exceso) y 5:1 (es decir, sacárido en exceso). Se prefieren relaciones entre 1:2 y 5:1, mientras que se prefieren más relaciones entre 1:1,25 y 1:2,5. Puede preferirse proteína portadora en exceso para MenA y MenC.

Pueden usarse conjugados junto con proteína portadora libre [51]. Cuando está presente una proteína portadora dada en forma tanto libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada preferentemente no es más del 5% de la cantidad total de la proteína portadora en la composición en total, y más preferentemente está presente en menos del 2% en peso.

Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier engarce adecuado cuando sea necesario.

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

Pueden realizarse enlaces mediante un grupo de engarce usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 54 y 55. Un tipo de enlace implica aminación reductora del polisacárido, acoplado el grupo amino resultante con un extremo del grupo de engarce de ácido adípico, y acoplado después una proteína con el otro extremo del grupo de engarce de ácido adípico [25, 56, 57]. Otros engarces incluyen B-propionamido [58], nitrofenil-etilamina [59], haloacil haluros [60], enlaces glicosídicos [61], ácido 6-aminocaproico [62], ADH [63], restos C₄ a C₁₂ [64] etc. Como alternativa a usar un engarce, puede usarse enlace directo. Los enlaces directos a la proteína pueden comprender oxidación del polisacárido seguido de animación reductora con la proteína, como se describe, por ejemplo, en las referencias 65 y 66.

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

Después de la conjugación, pueden separarse sacáridos libres y conjugados. Hay muchos procedimientos adecuados, incluyendo cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [véase también ref. 67 y 68, etc.].

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

Después de la conjugación, los procedimientos de la invención pueden incluir una etapa de medir el nivel de proteína portadora no conjugada. Un modo de realizar esta medición implica electroforesis capilar [69] (por ejemplo, en solución libre), o cromatografía electrocinética micelar [70].

Después de la conjugación, los procedimientos de la invención pueden incluir una etapa de medir el nivel de sacárido no conjugado. Un modo de realizar esta medición implica HPAEC-PAD [67].

Después de la conjugación, los procedimientos de la invención pueden incluir una etapa de separar sacárido conjugado de sacárido no conjugado. Un modo de separar estos sacáridos es usar un procedimiento que precipita selectivamente un componente. Se prefiere precipitación selectiva de sacárido conjugado, para dejar al sacárido no conjugado en solución, por ejemplo por un tratamiento de desoxicolato [67].

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

Oligosacáridos

En general se usarán sacáridos capsulares en forma de oligosacáridos. Estos se forman convenientemente por fragmentación de polisacárido capsular purificado (por ejemplo, por hidrólisis), lo que habitualmente se seguirá de purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

Se realiza preferentemente fragmentación de polisacáridos para proporcionar un grado de polimerización (GP)

medio final en el oligosacárido de menos de 30 (por ejemplo entre 10 y 20, preferentemente aproximadamente 10 para el serogrupo A; entre 15 y 25 para los serogrupos W135 y Y, preferentemente aproximadamente 15-20; entre 12 y 22 para el serogrupo C; etc.). El GP puede medirse convenientemente por cromatografía de intercambio iónico o por ensayos colorimétricos [72].

- 5 Si se realiza hidrólisis, el hidrolizado generalmente se cribará para retirar oligosacáridos de longitud corta [73]. Esto puede conseguirse de diversas formas, tales como ultrafiltración seguida de cromatografía de intercambio iónico. Los oligosacáridos con un grado de polimerización de menos de o igual a aproximadamente 6 se retiran preferentemente para el serogrupo A, y los de menos de aproximadamente 4 se retiran preferentemente para los serogrupos W135 y Y.
- 10 La hidrólisis química de sacáridos generalmente implica tratamiento con ácido o base en condiciones que son convencionales en la técnica. Las condiciones para despolimerización de sacáridos capsulares en sus monosacáridos constituyentes se conocen en la técnica. Un procedimiento de despolimerización implica el uso de peróxido de hidrógeno [11]. El peróxido de hidrógeno se añade a un sacárido (por ejemplo para proporcionar una concentración de H₂O₂ final de 1%), y la mezcla se incuba después (por ejemplo a aproximadamente 55 °C) hasta
- 15 que se ha conseguido una reducción de longitud de cadena deseada. La reducción a lo largo del tiempo puede seguirse retirando muestras de la mezcla y midiendo después el tamaño molecular (medio) del sacárido en la muestra. Después puede detenerse la despolimerización por enfriamiento rápido una vez que se ha conseguido la longitud de cadena deseada.

Serogrupo B

- 20 Las vacunas contra patógenos tales como virus de hepatitis B, difteria y tétanos contienen típicamente un antígeno proteico único (por ejemplo, el antígeno de superficie VHB, o un toxoide del tétanos). Por el contrario, las vacunas de tos ferina acelulares típicamente contienen al menos 3 proteínas de *B. pertussis* y la vacuna neumocócica PreVNar™ contiene siete antígenos sacáridos conjugados separados. Otras vacunas tales como vacunas de pertussis celulares, la vacuna del sarampión, la vacuna inactivada de la polio (IPV) y vacunas OMV meningocócicas son por
- 25 su propia naturaleza mezclas complejas de un gran número de antígenos. Si puede inducirse protección por un antígeno único, un pequeño número de antígenos definidos, o una mezcla compleja de antígenos no definidos, depende por lo tanto del patógeno en cuestión.

- Como se ha mencionado anteriormente, ha sido difícil encontrar una vacuna contra meningococo del serogrupo B. Las vacunas basadas en OMV muestran eficacia limitada. Además, el gran número de antígenos no definidos
- 30 presentes en una OMV, combinado con su naturaleza variable, significa que las OMV tienen diversos problemas de control de calidad.

- Los inventores han descubierto que puede conseguirse protección amplia contra infección de serogrupo B, y que esta puede conseguirse usando un número pequeño de antígenos polipeptídicos del serogrupo B definidos, y por lo tanto las composiciones de la invención incluyen una proteína "Nad A" en forma oligomérica, una proteína "741", una
- 35 proteína "936", una proteína "953" y una proteína "287".

Se han presentado secuencias genómicas para serogrupos meningocócicos A [74] y B [75,76].

La composición incluye los siguientes cinco antígenos [96]: (1) una proteína "NadA", en forma oligomérica (por ejemplo en forma trimérica); (2) una proteína "741"; (3) una proteína "936"; (4) una proteína "953"; y (5) una proteína "287".

- 40 "NadA" (adhesina de Neisseria A) de MenB se desvela como proteína "961" en la referencia 80 (SEC ID 2943 y 2944) y como "NMB1994" en la referencia 75 (véase también números de referencia de GenBank: 11352904 y 7227256). Puede encontrarse un estudio detallado de la proteína en la referencia 97. Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, NadA puede tomar diversas formas. Las formas preferidas de NadA son variantes de truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 83 a 85. En particular, se prefiere NadA sin su anclaje de membrana C terminal (por ejemplo delección de los restos 351-405 para la cepa 2996, para proporcionar
- 45 SEC ID N°: 1 en el presente documento), que en ocasiones se distingue en el presente documento mediante el uso de un superíndice "C" por ejemplo NadA^(C). La expresión de NadA sin su dominio de anclaje a membrana en *E. coli* da como resultado secreción de la proteína al sobrenadante de cultivo con retirada conjunta de su péptido líder de 23 unidades (por ejemplo para dejar uno de 327 unidades para la cepa 2996 [SEC ID N°: 2 en el presente documento]). Los polipéptidos sin sus péptidos líder se distinguen en ocasiones en el presente documento mediante
- 50 el uso de un superíndice "NL", por ejemplo NadA^(NL) o NadA^{(C)(NL)}. Los polipéptidos NadA preferidos tienen una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene el 50% o más de identidad (por ejemplo 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con SEC ID N°: 2; y/o (b) comprende un fragmento de al menos *n* aminoácidos consecutivos de SEC ID N°: 1, en el que *n* es 7 o más (por ejemplo 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más).
- 55 Los fragmentos preferidos para (b) carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C terminal y/o el N terminal de SEC ID N°: 1 (por ejemplo NadA^(C), NadA^(NL), NadA^{(C)(NL)}). Otros fragmentos preferidos comprenden un epítipo de SEC ID 1, y un fragmento particularmente preferido de SEC ID 1 es SEC ID 2. Estas diversas secuencias incluyen variantes de NadA (por ejemplo variantes

alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Se muestran diversas secuencias de NadA en la Figura 9 de la referencia 98.

La proteína "741" de MenB se desvela en la referencia 80 (SEC ID 2535 y 2536) y como "NMB1870" en la referencia 75 (véase también número de referencia de GenBank GI:7227128). La proteína correspondiente en el serogrupo A [74] tiene el número de referencia de GenBank 7379322. 741 es de forma natural una lipoproteína. Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 741 puede tomar diversas formas. Las formas preferidas de 741 son variantes de truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 83 a 85. En particular, el extremo N terminal de 741 puede suprimirse hasta e incluyendo su secuencia de poliglicina (es decir delección de los restos 1 a 72 para la cepa MC58 [SEC ID N°: 3 en el presente documento]), que en ocasiones se distingue en el presente documento mediante el uso de un prefijo "ΔG". Esta delección puede potenciar la expresión. La delección también retira un sitio de lipidación de 741. Las secuencias de 741 tienen una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene 50% o más de identidad con SEC ID N°: 3; y/o (b) comprende un fragmento de al menos un aminoácido consecutivo de SEC ID N°: 3, y comprende un epítipo de 741. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C terminal y/o el N terminal de SEC ID N°: 3. Estas secuencias incluyen variantes de 741 (por ejemplo variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Pueden encontrarse diversas secuencias de 741 en SEC ID 1 a 22 de la referencia 85, en SEC ID 1 a 23 de la referencia 99 y en SEC ID 1-299 de la referencia 100.

La proteína "936" del serogrupo B se desvela en la referencia 80 (SEC ID 2883 y 2884) y como "NMB2091" en la referencia 75 (véase también número de referencia de GenBank GI:7227353). El gen correspondiente en el serogrupo A [74] tiene el número de referencia de GenBank 7379093. Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 936 puede tomar diversas formas. Las formas preferidas de 936 son variantes de truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 83 a 85. En particular, el péptido líder N-terminal de 936 puede suprimirse (por ejemplo delección de los restos 1 a 23 para la cepa MC58, para proporcionar 936^(NL) [SEC ID N°: 4 en el presente documento]). Las secuencias de 936 tienen una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene 50% o más de identidad con SEC ID N°: 4; y/o (b) comprende un fragmento de al menos un aminoácido consecutivo de SEC ID N° 4, y comprende un epítipo de 936. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C terminal y/o el N terminal de SEC ID N°: 4. Estas secuencias incluyen variantes de 936 (por ejemplo variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.).

La proteína "953" del serogrupo B se desvela en la referencia 80 (SEC ID 2917 y 2918) y como "NMB1030" en la referencia 75 (véase también número de referencia de GenBank GI:7226269). La proteína correspondiente en el serogrupo A [74] tiene el número de referencia de GenBank 7380108. Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 953 puede tomar diversas formas. Las formas preferidas de 953 son variantes de truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 83 a 85. En particular, el péptido líder N terminal de 953 puede suprimirse (por ejemplo delección de los restos 1 a 19 para la cepa MC58, para proporcionar 953^(NL) [SEC ID N°: 5 en el presente documento]). Las secuencias de 953 preferidas tienen una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene el 50% o más de identidad (por ejemplo 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con SEC ID N°: 5; y/o (b) comprende un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de SEC ID N°: 5, en el que n es 7 o más (por ejemplo 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos para (b) comprenden un epítipo de 953. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C terminal y/o el N terminal de SEC ID N°: 5. Estas secuencias incluyen variantes de 936 (por ejemplo variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Pueden verse formas alélicas de 953 en la Figura 19 de la referencia 82.

La proteína "287" del serogrupo B se desvela en la referencia 80 (SEC ID 3103 y 3104), como "NMB2132" en la referencia 75 y como "GNA2132" en la referencia 77 (véase también número de referencia de GenBank GI:7227388). La proteína correspondiente en el serogrupo A [74] tiene el número de referencia de GenBank 7379057. Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 287 puede tomar diversas formas. Las formas preferidas de 287 son variantes de truncamiento o delección, tales como las desveladas en las referencias 83 a 85. En particular, el extremo N terminal de 287 puede suprimirse hasta e incluyendo su secuencia de poliglicina (por ejemplo delección de los restos 1 a 24 para la cepa MC58, para proporcionar ΔG287 [SEC ID N°: 6 en el presente documento]). Esta delección puede potenciar la expresión. Las secuencias de 287 preferidas tienen una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene 50% o más de identidad (por ejemplo 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con SEC ID N°: 6; y/o (b) comprende un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de SEC ID N°: 6, en el que n es 7 o más (por ejemplo 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos para (b) comprenden un epítipo de 287. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C terminal y/o el N terminal de SEC ID N°: 6. Estas secuencias incluyen variantes de 287 (por ejemplo variantes alélicas, homólogos, ortólogos, parálogos, mutantes, etc.). Pueden verse formas alélicas de 287 en las Figuras 5 y 15 de la referencia 82, y en el Ejemplo 13 y la Figura 21 de la referencia 80 (SEC ID 3179 a 3184).

Los antígenos de MenB preferidos comprenden una secuencia de aminoácidos hallada en una de las cepas 2996, MC58, 95N477 y 394/98. La proteína 287 es preferentemente de la cepa 2996 o, más preferentemente, de la cepa 394/98. La proteína 741 es preferentemente de las cepas de serogrupo B MC58, 2996, 394/98 o 95N477, o de la

cepa de serogrupo C 90/18311. Se prefiere más la cepa MC58. Las proteínas 936, 953 y NadA son preferentemente de la cepa 2996. La composición puede incluir un antígeno particular (por ejemplo 741 o 287) en más de una forma variante, por ejemplo la misma proteína, pero de más de una cepa. Estas proteínas pueden incluirse como proteínas en tándem o separadas.

5 En algunas realizaciones, sin embargo, la composición de la invención incluye la misma proteína pero de más de una cepa. Se ha descubierto que este enfoque es eficaz con la proteína 741. Esta proteína es un antígeno extremadamente eficaz para inducir respuestas de anticuerpos anti-meningocócicos, y se expresa en todos los serogrupos meningocócicos. El análisis filogenético muestra que la proteína se divide en dos grupos, y que uno de estos se divide de nuevo para proporcionar tres variantes en total [101], y aunque el suero inducido contra una variante dada es bactericida dentro del mismo grupo variante, no es activo contra cepas que expresen una de las otras dos variantes, es decir hay protección cruzada intra-variante, pero no protección cruzada inter-variante [99, 101]. Para eficacia de cepa cruzada máxima, por lo tanto, se prefiere que una composición incluya más de una variante de la proteína 741. Se proporciona una secuencia ejemplar de cada variante en las SEC ID N°: 10, 11 y 12 del presente documento, comenzando con un resto de cisteína N terminal con el que se unirá covalentemente un lípido en la forma lipoproteica nativa. Se prefiere por lo tanto que la composición incluya al menos dos de: (1) una primera proteína, que comprenda una secuencia de aminoácidos que tenga al menos $a\%$ de identidad de secuencia con SEC ID N°: 10 y/o que comprenda una secuencia de aminoácidos que consista en un fragmento de al menos x aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 10; (2) una segunda proteína, que comprenda una secuencia de aminoácidos que tenga al menos $b\%$ de identidad de secuencia con SEC ID N°: 11 y/o que comprenda una secuencia de aminoácidos que consista en un fragmento de al menos y aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 11; y (3) una tercera proteína, que comprenda una secuencia de aminoácidos que tenga al menos $c\%$ de identidad de secuencia con SEC ID N°: 12 y/o que comprenda una secuencia de aminoácidos que consista en un fragmento de al menos z aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 12. El valor de a es al menos 85, por ejemplo 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. El valor de b es al menos 85 por ejemplo 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. El valor de c es al menos 85 por ejemplo 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. Los valores de a , b y c no están relacionados de forma intrínseca entre sí. El valor de x es al menos 7, (por ejemplo 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). El valor de y es al menos 7, (por ejemplo 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). El valor de z es al menos 7, por ejemplo (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). Los valores de x , y y z no están relacionados de forma intrínseca entre sí. Se prefiere que cualquier secuencia de aminoácidos de 741 dada no entre en más de una de las categorías (1), (2) y (3). Cualquier secuencia de 741 dada entrará por lo tanto en solamente una de las categorías (1), (2) y (3). Se prefiere por lo tanto que: la proteína (1) tenga menos de $i\%$ de identidad de secuencia con la proteína (2); la proteína (1) tenga menos de $j\%$ de identidad de secuencia con la proteína (3); y la proteína (2) tenga menos de $k\%$ de identidad de secuencia con la proteína (3). El valor de i es 60 o más (por ejemplo 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, etc.) y es como máximo a . El valor de j es 60 o más (por ejemplo 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, etc.) y es como máximo b . El valor de k es 60 o más (por ejemplo 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, etc.) y es como máximo c . Los valores de i , j y k no están relacionados de forma intrínseca entre sí.

Las composiciones de la invención incluyen un número pequeño (por ejemplo, menos de t antígenos, siendo t 10, 9, 8, 7 o 6) de antígenos de serogrupo B purificados. Se prefiere particularmente que la composición no incluya mezclas complejas o indefinidas de antígenos, por ejemplo se prefiere que no incluya vesículas de membrana externa en la composición. Los antígenos se expresan preferentemente de forma recombinante en un huésped heterólogo y después se purifican. Para una composición que incluya t antígenos MenB, puede haber t polipéptidos separados pero, para reducir la complejidad aún más, se prefiere que al menos dos de los antígenos se expresen como una cadena polipeptídica sencilla (una proteína "híbrida" [ref. 83 a 85]) es decir de modo que los 5 antígenos formen menos de 5 polipéptidos. Las proteínas híbridas ofrecen dos ventajas principales: en primer lugar, puede ayudarse a una proteína que puede ser inestable o expresarse de forma escasa por sí misma añadiendo un compañero híbrido adecuado que supere el problema; en segundo lugar, la fabricación comercial se simplifica ya que solo es necesario emplear una expresión y purificación para producir dos proteínas útiles por separado. Una proteína híbrida incluida en una composición de la invención puede comprender dos o más (es decir, 2, 3, 4 o 5) de los cinco antígenos enumerados anteriormente. Se prefieren híbridos que consistan en dos de los cinco antígenos.

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

Las proteínas híbridas pueden representarse por la fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}[\text{-X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, en la que: X es una secuencia de aminoácidos de uno de los cinco antígenos básicos; L es una secuencia de aminoácidos de engarce opcional; A es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional; B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional y n

es 2, 3, 4 o 5.

Más preferentemente, n es 2. Dos híbridos antigénicos para su uso en la invención comprenden: NadA y 741; NadA y 936 NadA y 953; NadA y 287; 741 y 936; 741 y 953; 741 y 287; 936 y 953; 936 y 287; 953 y 287. Dos proteínas preferidas son: X₁ es una 936 y X₂ es una 741; X₁ es una 287 y X₂ es una 953.

- 5 Si un resto -X- tiene una secuencia de péptido líder en su forma natural, esta puede incluirse u omitirse en la proteína híbrida. En algunas realizaciones, los péptidos líder se suprimirán excepto para el del resto -X- localizado en el extremo N terminal de la proteína híbrida, es decir el péptido líder de X₁ se conservará, pero los péptidos líder de X₂... X_n se omitirán. Esto es equivalente a suprimir todos los péptidos líder y usar el péptido líder de X₁ como resto -A-.
- 10 Para cada n casos de [-X-L-], puede estar presente o ausente la secuencia de aminoácidos de engarce -L-. Por ejemplo, cuando n = 2 el híbrido puede ser NH₂-X₁-L₁-X₂-L₂-COOH, NH₂-X₁-X₂-COOH, NH₂-X₁-L₁-X₂-COOH, NH₂-X₁-X₂-L₂-COOH, etc. La secuencia o las secuencias de aminoácidos de engarce -L- típicamente serán cortas (por ejemplo, 20 o menos aminoácidos, es decir 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos comprenden secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación, engarces de poliglicina (es decir, que comprenden Gly_n en la que n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), y marcadores de histidina (es decir, His_n en la que n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de aminoácidos de engarce adecuadas resultarán evidentes para los expertos en la materia. Un engarce útil es GSGGGG (SEC ID 9), formándose el dipéptido Gly-Ser a partir de un sitio de restricción BamHI, ayudando de este modo a la clonación y manipulación, y siendo el tetrapéptido (Gly)₄ un engarce de poliglicina típico. Si X_{n+1} es una proteína ΔG y L_n es un engarce de glicina, esto puede ser equivalente a que X_{n+1} no sea una proteína ΔG y que L_n esté ausente.

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

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

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

n	A	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	B	SEC ID N°:
2	MA	ΔG287	GSGGGG	953 ^(NL)	-	-	7
2	M	936 ^(NL)	GSGGGG	ΔG741	-	-	8

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

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

50 La composición no necesita inducir anticuerpos bactericidas contra todas y cada una de las cepas de MenB dentro de estos linajes hipervirulentos, sino que, para cualquier grupo dado de cuatro o más cepas de meningococo del serogrupo B dentro de un linaje hipervirulento particular, los anticuerpos inducidos por la composición son bactericidas contra al menos el 50% (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90% o más) del grupo. Los grupos preferidos de

cepas incluirán cepas aisladas en al menos cuatro de los siguientes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR y CU. El suero tiene preferentemente un título bactericida de al menos 1024 (por ejemplo, 2^{10} , 2^{11} , 2^{12} , 2^{13} , 2^{14} , 2^{15} , 2^{16} , 2^{17} , 2^{18} o más, preferentemente al menos 2^{14}), es decir el suero es capaz de destruir al menos el 50% de las bacterias de ensayo de una cepa particular cuando se diluye 1/1024, como se describe en la referencia 77.

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

Otros antígenos polipeptídicos de MenB que pueden incluirse en composiciones de la invención incluyen los que comprenden una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEC ID N°: 650 de ref. 78; SEC ID N°: 878 de ref. 78; SEC ID N°: 884 de ref. 78; SEC ID N°: 4 de ref. 79; SEC ID N°: 598 de ref. 80; SEC ID N°: 818 de ref. 80; SEC ID N°: 864 de ref. 80; SEC ID N°: 866 de ref. 80; SEC ID N°: 1196 de ref. 80; SEC ID N°: 1272 de ref. 80; SEC ID N°: 1274 de ref. 80; SEC ID N°: 1640 de ref. 80; SEC ID N°: 1788 de ref. 80; SEC ID N°: 2288 de ref. 80; SEC ID N°: 2466 de ref. 80; SEC ID N°: 2554 de ref. 80; SEC ID N°: 2576 de ref. 80; SEC ID N°: 2606 de ref. 80; SEC ID N°: 2608 de ref. 80; SEC ID N°: 2616 de ref. 80; SEC ID N°: 2668 de ref. 80; SEC ID N°: 2780 de ref. 80; SEC ID N°: 2932 de ref. 80; SEC ID N°: 2958 de ref. 80; SEC ID N°: 2970 de ref. 80; SEC ID N°: 2988 de ref. 80, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene el 50% o más de identidad (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) con dichas secuencias; y/o (b) comprende un fragmento de al menos n aminoácidos consecutivos de dichas secuencias, en el que n es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferidos para (b) comprenden un epítipo de la secuencia relevante. Puede incluirse más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más) de estos polipéptidos.

Más componentes antigénicos

También pueden incluirse antígenos no meningocócicos y no de *Neisseria*, preferentemente que no disminuyan la respuesta inmune contra los componentes meningocócicos, en composiciones de la invención. Ref. 107, por ejemplo, desvela combinaciones de oligosacáridos de los serogrupos de *N. meningitidis*. B y C junto con el sacárido Hib. Los antígenos no meningocócicos particularmente preferidos incluyen:

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

La mezcla puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales, que pueden detoxificarse cuando sea necesario (por ejemplo, detoxificación de toxina de pertussis por medios químicos y/o genéticos).

50 Cuando se incluye un antígeno diftérico en la mezcla se prefiere también que incluya antígeno del tétanos y antígenos de pertussis. De forma similar, cuando se incluye un antígeno del tétanos se prefiere también que incluya antígenos diftérico y de pertussis. De forma similar, cuando se incluye un antígeno de pertussis también se prefiere que incluya antígenos diftérico y del tétanos.

Los antígenos en la mezcla típicamente estarán presentes a una concentración de al menos 1 $\mu\text{g/ml}$ cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para inducir una respuesta inmune contra ese antígeno. Se prefiere que la eficacia protectora de antígenos sacáridos individuales no se retire combinándolos, aunque puede reducirse la inmunogenicidad real (por ejemplo, títulos de ELISA).

Como alternativa a usar antígenos proteicos en la mezcla, puede usarse ácido nucleico que codifica el antígeno. Los componentes proteicos de la mezcla pueden por lo tanto reemplazarse por ácido nucleico (preferentemente ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifica la proteína. De forma similar, las composiciones de la invención

pueden comprender proteínas que se asemejan a los antígenos sacáridos, por ejemplo, mimótopos [117] o anticuerpos anti-idiotípicos. Estos pueden reemplazar componentes sacáridos individuales o pueden complementarlos. Como ejemplo, la vacuna puede comprender un mimético peptídico del polisacárido capsular MenC [118] o el MenA [119] en lugar del sacárido en sí mismo.

- 5 Dos antígenos no meningocócicos preferidos para inclusión en composiciones de la invención son los que protegen contra *H. influenzae* de tipo B (Hib) y contra *Streptococcus pneumoniae*.

Haemophilus influenzae tipo B (Hib)

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

- 10 Provechosamente, el sacárido de Hib se conjuga covalentemente con una proteína portadora, para potenciar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados polisacáridos en general, y del polisacárido capsular Hib en particular, está bien documentada [por ejemplo, referencias 21-29, etc.]. La invención puede usar cualquier conjugado de Hib adecuado. Se han descrito anteriormente proteínas portadoras adecuadas, y son portadores preferidos para sacáridos de Hib CRM₁₉₇ ("HbOC"), toxoide del tétanos ("PRP-T") y el complejo de
15 membrana externa de *N. meningitidis* ("PRP-OMP").

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

Un conjugado preferido comprende un oligosacárido Hib unido covalentemente con CRM₁₉₇ mediante un engarce de un ácido adípico [120, 121]. El toxoide del tétanos también es un vehículo preferido.

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

Cuando una composición incluye un antígeno sacárido de Hib, se prefiere que no incluya también un adyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio entonces el antígeno de Hib puede absorberse en el adyuvante [122] o puede estar no adsorbido [123]. Puede conseguirse prevención de la adsorción seleccionando el pH correcto durante la mezcla de antígeno/adyuvante, un adyuvante con un punto de carga cero apropiado, y un orden apropiado de mezcla para los diversos antígenos diferentes en una composición [124].

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

30 *Streptococcus pneumoniae*

Cuando la composición incluye un antígeno de *S. pneumoniae* típicamente será un antígeno sacárido capsular que esté conjugado preferentemente con una proteína portadora [por ejemplo, ref. 125 a 127]. Se prefiere incluir sacáridos de más de un serotipo de *S pneumoniae*. Por ejemplo, se usan ampliamente mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes, así como vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 y 11 serotipos diferentes [128].
35 Por ejemplo, PreVNar™ [1] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) con cada sacárido conjugado individualmente con CRM₁₉₇ por aminación reductora, con 2 μg de cada sacárido por cada dosis de 0,5 ml (4 μg de serotipo 6B), y con conjugados adsorbidos en un adyuvante de fosfato de aluminio. Las composiciones de la invención preferentemente incluyen al menos los serotipos 6B, 14, 19F y 23F. Los conjugados pueden adsorberse en un fosfato de aluminio.

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

En algunas realizaciones, la composición puede incluir antígenos tanto sacáridos como polipeptídicos de neumococos. Estos pueden usarse en mezcla sencilla, o el antígeno sacárido neumocócico puede conjugarse con una proteína neumocócica. Las proteínas portadoras adecuadas para tales realizaciones incluyen los antígenos enumerados en el párrafo anterior [137].

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

Composiciones farmacéuticas

La composición de la invención típicamente, además de los componentes mencionados anteriormente, comprenderá uno o más "vehículos farmacéuticamente aceptables", que incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo

- la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa [138], trehalosa [139], lactosa y agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas). Tales vehículos se conocen bien por los expertos habituales en la materia. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias adyuvantes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH y similares. La solución salina fisiológica tamponada con fosfato, sin pirógenos, estéril es un vehículo típico. Está disponible un análisis exhaustivo de excipientes farmacéuticamente aceptables en la referencia 140.
- 5 Las composiciones de la invención están en forma acuosa, es decir soluciones o suspensiones. La formulación líquida de este tipo permite que las composiciones se administren directamente desde su forma envasada, sin necesidad de reconstitución en un medio acuoso, y son por lo tanto ideales para inyección. Las composiciones pueden presentarse en frascos, o pueden presentarse en jeringas previamente cargadas. Las jeringas pueden proporcionarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una dosis única de la composición, mientras que un frasco puede incluir una dosis única o múltiples dosis.
- 10 Las composiciones líquidas de la invención también son adecuadas para reconstituir otras vacunas a partir de una forma liofilizada por ejemplo para reconstituir antígenos Hib o DTP liofilizados. Cuando deba usarse una composición de la invención para dicha reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit, que puede comprender dos frascos, o puede comprender una jeringa previamente cargada y un frasco, usándose los contenidos de la jeringa para reactivar los contenidos del frasco antes de la inyección.
- 15 Las composiciones de la invención pueden envasarse en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiple. Para formas de dosis múltiple, se prefieren frascos a jeringas precargadas. Pueden establecerse de forma rutinaria volúmenes de dosificación eficaces, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.
- 20 El pH de la composición está preferentemente entre 6 y 8, preferentemente aproximadamente 7. Puede mantenerse pH estable mediante el uso de un tampón. Si una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón de histidina [141]. La composición puede ser estéril y/o sin pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a seres humanos.
- 25 Las composiciones de la invención son inmunogénicas, y son más preferentemente composiciones de vacuna. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir para prevenir infección) o terapéuticas (es decir para tratar infección), pero típicamente serán profilácticas. Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno o antígenos, así como cualquier otro componente, según se necesite. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de ese compuesto a un individuo, en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o prevención.
- 30 Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación por parte del médico tratante de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad quede en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos rutinarios.
- 35 Dentro de cada dosis, la cantidad de un antígeno sacárido individual generalmente estará entre 1 y 50 μg (medido como masa de sacárido), por ejemplo aproximadamente 1 μg , aproximadamente 2,5 μg , aproximadamente 4 μg , aproximadamente 5 μg o aproximadamente 10 μg .
- 40 Cada sacárido puede estar presente sustancialmente en la misma cantidad por dosis. Sin embargo, la relación (p/p) de sacárido MenY: sacárido MenW135 puede ser mayor de 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor) y/o la relación (p/p) del sacárido MenY: sacárido MenC puede ser menor de 1 (por ejemplo, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o menor).
- 45 Las relaciones preferidas (p/p) para sacáridos de serogrupos A:C:W135:Y son: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; y 2:2:2:1. Las relaciones preferidas (p/p) para sacáridos de los serogrupos C:W135:Y son: 1:1:1; 1:1:2; 1:1:1; 2:1:1; 4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1; y 2:1:1. Se prefiere usar una masa sustancialmente igual de cada sacárido.
- 50 Las composiciones preferidas de la invención comprenden menos de 50 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 40 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 30 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 25 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 20 μg de sacárido meningocócico por dosis. Otras composiciones preferidas comprenden ≤ 10 μg de sacárido meningocócico por dosis pero, idealmente, las composiciones de la invención comprenden al menos 10 μg de sacárido meningocócico total por dosis.
- 55

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

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

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

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

- 10 Las composiciones de la invención generalmente se administrarán junto con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones incluirán habitualmente uno o más adyuvantes. Tales adyuvantes incluyen, pero sin limitación:

A. Composiciones que contienen minerales

- 15 Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxido), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véase capítulos 8 y 9 de ref. 142], o mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose la adsorción. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [143].

B. Emulsiones de aceite

- 20 Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 [capítulo 10 de ref. 142; véase también ref. 144] (escualeno 5%, Tween 80 0,5% y Span 85 0,5%, formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidificador). También pueden usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

C. Formulaciones de saponina. [Capítulo 22 de ref. 142]

- 25 También pueden usarse formulaciones de saponina como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glicósidos de esteroles y glicósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia serie de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como adyuvante. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (jabonera). Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™.
- 30

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

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

- 40 Puede encontrarse una recapitulación del desarrollo de adyuvantes basados en saponina en ref. 150 y 151.

D. Viroomas y partículas de tipo viral

- 45 También pueden usarse virosomas y partículas de tipo viral (VLP) como adyuvantes en la invención. Estas estructuras generalmente contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. Estas son generalmente no patógenas, no replicativas y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse de forma recombinante o aislarse de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas de virus de la gripe (tales como HA o NA), virus de hepatitis B (tales como proteínas del núcleo o la cápsida), virus de hepatitis E, virus de sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de glosopedia, retrovirus, virus Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q-beta (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como proteína p1 de retrotransposón Ty). Se analizan VLP adicionalmente en las ref. 152-157. Se analizan adicionalmente virosomas en, por ejemplo, la ref. 158
- 50

E. Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados de lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas que ribosilan ADP y derivados detoxificados de los mismos.

- 5 Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma de “partícula pequeña” preferida de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado se desvela en ref. 159. Tales “partículas pequeñas” de 3dMPL son suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 μm [159].
 10 Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A, tales como derivados de aminoalquil glucosaminida fosfato, por ejemplo RC-529 [160.161].

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

- 15 Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no metilada unida por un enlace fosfato con una guanósina). También se ha demostrado que los ARN bicatenarios y oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimuladores.

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

La secuencia CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [173]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune de Th1, tal como ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como ODN CpG-B. Se analizan ODN CpG-A y CpG-B en las ref. 174-176. Preferentemente, la CpG es un ODN CpG-A.

- 25 Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' sea accesible para reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias oligonucleotídicas CpG pueden estar unidas en sus extremos 3' para formar “inmunómeros”. Véase, por ejemplo, ref. 173 y 177-179.

- 30 Las toxinas bacterianas que ribosilan ADP y derivados detoxificados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina lábil por calor de *E. coli* “LT”), cólera (“CT”) o pertussis (“PT”). El uso de toxinas que ribosilan ADP detoxificadas como adyuvantes de mucosa se describe en ref. 180 y como adyuvantes parenterales en ref. 181. La toxina o toxoide está preferentemente en forma de una holotoxina, que comprende subunidades tanto A como B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación detoxificante; preferentemente la subunidad B no está mutada.
 35 Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT detoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas que ribosilan ADP y derivados detoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las ref. 182-189. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas que ribosilan ADP expuestas en ref. 190, incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad.

F. Inmunomoduladores humanos

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

G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

- 45 También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [193] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosán y derivados del mismo como adyuvantes en la invención [194].

H. Micropartículas

- 50 También pueden usarse micropartículas como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (es decir una partícula de ~100 nm a ~150 μm de diámetro, más preferentemente de ~200 nm a ~30 μm de diámetro, y más preferentemente de ~500 nm a ~10 μm de diámetro) formadas a partir de materiales que sean biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α -hidroxi ácido), un ácido polihidroxibutírico, un polioctoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolido), opcionalmente tratadas para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente

catiónico, tal como CTAB).

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

Se describen ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes en ref. 195-197.

J. Formulaciones de polioxietilén éter y polioxietilén éster

5 Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen polioxietilén éteres y polioxietilén ésteres [198]. Tales formulaciones incluyen además tensioactivos de polioxietilén sorbitán éster en combinación con un octoxinol [199] así como tensioactivos de polioxietilén alquil éteres o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [200]. Los polioxietilén éteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo:
10 polioxietilén-9-lauril éter (laureth 9), polioxietilén-9-esteoril éter, polioxietilén-8-esteoril éter, polioxietilén-4-lauril éter, polioxietilén-35-lauril éter y polioxietilén-23-lauril éter.

K. Polifosfaceno (PCPP)

Se describen formulaciones de PCPP, por ejemplo, en ref. 201 y 202.

L. Péptidos de muramilo

15 Los ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina MTP-PE).

M. Compuestos de imidazoquinolona.

20 Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen imiquamod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las ref. 203 y 204.

La invención puede también comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse las siguientes composiciones de adyuvante en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [205]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [206]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [207]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [208]; (6) SAF, que contiene escualano 10%, Tween 80™ 0,4% polímero en bloque de pluronic 5% L121 y thr-MDP, microfluidificado en una emulsión submicrométrica o agitado en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partículas. (7) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene escualano 2%, Tween 80 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

Se desvelan otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores en el capítulo 7 de la ref. 142.

35 Se prefiere particularmente el uso de adyuvantes de sales de aluminio, y se adsorben generalmente antígenos en tales sales. Los conjugados Menjugate™ y NeisVac™ MenC usan un adyuvante de hidróxido, mientras que Meningitec™ usa un fosfato. Es posible en composiciones de la invención adsorber algunos antígenos en un hidróxido de aluminio pero tener otros antígenos en asociación con un fosfato de aluminio. En general, sin embargo, se prefiere usar solamente una sal única por ejemplo un hidróxido o un fosfato, pero no ambas. Preferentemente se evita el hidróxido de aluminio como un adyuvante, particularmente si la composición incluye un antígeno de Hib. Se prefieren por lo tanto composiciones que no contengan hidróxido de aluminio. En su lugar, pueden usarse fosfatos de aluminio, y un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar de PO₄/Al entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de Al³⁺/ml. Puede usarse adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio por ejemplo entre 50 y 100 µg de Al³⁺ por conjugado por dosis. Cuando se usa un fosfato de aluminio y se desea que no se adsorba un antígeno en el adyuvante, esto se favorece incluyendo iones de fosfato libres en solución (por ejemplo, mediante el uso de un tampón fosfato).

No es necesario que se adsorban todos los conjugados, es decir algunos o todos pueden estar libres en solución.

El fosfato cálcico es otro adyuvante preferido.

Procedimientos de tratamiento

50 La invención también proporciona un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos en un mamífero, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención al mamífero.

La invención proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmune en un mamífero que comprende la

etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición de la invención. La respuesta inmune es preferentemente protectora y preferentemente implica anticuerpos. El procedimiento puede inducir una respuesta de refuerzo.

5 El mamífero es preferentemente un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño en edad de empezar a caminar o un bebé) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adulto. Una vacuna pretendida para niños también puede administrarse a adultos por ejemplo para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

10 La invención también proporciona una composición de la invención para su uso como un medicamento. El medicamento es preferentemente capaz de inducir una respuesta inmune en un mamífero (es decir, es una composición inmunogénica) y es más preferentemente una vacuna.

15 La invención también proporciona el uso de (i) un antígeno sacárido capsular de serogrupo C conjugado; (ii) un antígeno sacárido capsular de serogrupo W135 conjugado; (iii) un antígeno de sacárido capsular de serogrupo Y conjugado; (iv) una proteína "NadA" en forma oligomérica, una proteína "741", una proteína "936", una proteína "953" y una proteína "287"; y, opcionalmente, (v) un antígeno sacárido capsular de serogrupo A conjugado, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune en un mamífero

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

20 Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica supervisar la infección por *Neisseria* después de la administración de la composición de la invención. Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica supervisar las respuestas inmunes frente a los cinco antígenos básicos después de la administración de la composición. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención puede determinarse administrándolas a sujetos de ensayo (por ejemplo, niños de 12-16 meses de edad, o modelos animales [209]) y determinando después los parámetros convencionales incluyendo anticuerpos bactericidas en suero (SBA) y títulos de ELISA (GMT) de IgG anticápsula total y de alta avidéz. Estas respuestas inmunes generalmente se determinarán aproximadamente 4 semanas después de la administración de la composición, y se compararán con los valores determinados antes de la administración de la composición. Se prefiere un aumento de SBA de al menos 4 veces u 8 veces. Cuando se administra más de una dosis de la composición, puede realizarse más de una determinación después de la administración.

30 Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpo en un paciente que es superior al criterio para seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Se conocen bien antígenos con un título de anticuerpo asociado por encima del cual se considera que un huésped está seroconvertido frente al antígeno, y tales títulos están publicados por organizaciones tales como la OMS. Preferentemente más del 80% de una muestra de sujetos estadísticamente significativa está seroconvertido, más
35 preferentemente más del 90%, aún más preferentemente más del 93% y más preferentemente 96-100%.

Las composiciones de la invención se administrarán generalmente directamente a un paciente. El suministro directo puede conseguirse mediante inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, vía intraperitoneal, vía intravenosa, vía intramuscular o al espacio intersticial de un tejido), o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, ótica, pulmonar u otra mucosa. Se prefiere administración intramuscular en el muslo o el brazo. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero puede usarse como alternativa inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

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

45 El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples. Pueden usarse dosis múltiples en un programa de inmunización primario y/o en un programa de inmunización de refuerzo. Un programa de dosis primaria puede seguirse de un programa de dosis de refuerzo. La elección del momento adecuado entre dosis de sensibilización (por ejemplo, entre 4 y 16 semanas), y entre sensibilización y refuerzo, puede determinarse de forma rutinaria.

50 Las infecciones por *Neisseria* afectan a diversas áreas del cuerpo y por lo tanto las composiciones de la invención pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, bien como soluciones o bien como suspensiones líquidas. La composición puede prepararse para administración pulmonar por ejemplo como un inhalador, usando un polvo fino o una pulverización. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, ótica u ocular, por ejemplo como pulverización, gotas, gel o polvo [por ejemplo, ref. 210 y 211]. Se ha notificado éxito con la administración nasal de sacáridos neumocócicos [212.213], polipéptidos neumocócicos [214], sacáridos de Hib [215], sacáridos de MenC [216] y mezclas de conjugados de sacáridos de Hib y MenC [217].

Estabilidad en el almacenamiento

Las composiciones de la invención aportan estabilidad mejorada, particularmente para el componente sacárido del serogrupo A. La invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de vacuna, que comprende las etapas: (1) mezclar (i) un antígeno sacárido capsular del serogrupo C conjugado, (ii) un antígeno sacárido capsular del serogrupo W135 conjugado, (iii) un antígeno de sacárido capsular del serogrupo Y conjugado y (iv) una proteína "NadA" en forma oligomérica, una proteína "741", una proteína "936", una proteína "953" y una proteína "287"; (2) almacenar la composición resultante de la etapa (1) durante al menos 1 semana; (3) preparar una jeringa que contenga la composición almacenada de la etapa (2), lista para inyección a un paciente; y opcionalmente (4) inyectar la composición al paciente.

5 La etapa (1) puede también implicar mezclar (v) un antígeno sacárido capsular de serogrupo A conjugado. También puede implicar mezclar (vi) un antígeno de Hib conjugado. También puede implicar mezclar (vii) un antígeno neumocócico. La etapa (2) preferentemente implica al menos 2 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 12 semanas o más de almacenamiento. La etapa de almacenamiento (2) puede ser o no por debajo de temperatura ambiente (por ejemplo, a 10 ± 10 °C).

15 La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición de vacuna, que comprende las etapas de: (1) mezclar (i) un antígeno sacárido capsular del serogrupo C conjugado, (ii) un antígeno sacárido capsular del serogrupo W135 conjugado, (iii) un antígeno sacárido capsular del serogrupo Y conjugado y (iv) una proteína "NadA" en forma oligomérica, una proteína "741", una proteína "936", una proteína "953" y una proteína "287"; y (2) extraer un volumen de dosis unitaria de los antígenos mezclados; y (c) envasar la dosis unitaria extraída en un recipiente sellado de forma hermética.

20 La etapa (1) también puede implicar mezclar (v) un antígeno sacárido capsular del serogrupo A conjugado. También puede implicar mezclar (vi) un antígeno de Hib conjugado. También puede implicar mezclar (vii) un antígeno neumocócico. El recipiente sellado herméticamente puede ser un frasco o una jeringa.

La invención proporciona un recipiente sellado de forma hermética que contiene una composición de la invención.

25 General

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

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

30 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo una composición que está "sustancialmente sin" Y puede estar completamente sin Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

35 Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significan que, cuando se alinean, ese porcentaje de aminoácidos son iguales al comparar las dos secuencias. Este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia puede determinarse usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en la sección 7.7.18 de la referencia 218. Se determina un alineamiento preferido por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de hueco afín con una penalización de hueco abierto de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en la referencia 219.

40 El término "alquilo" se refiere a grupos alquilo en formas tanto lineales como ramificadas. El grupo alquilo puede estar interrumpido con 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de -O-, -NH- o -S-. El grupo alquilo también puede estar interrumpido con 1, 2 o 3 dobles y/o triples enlaces. Sin embargo, el término "alquilo" habitualmente se refiere a grupos alquilo que no tienen interrupciones de heteroátomos o interrupciones de doble o triple enlace. Cuando se hace referencia a alquilo C₁₋₁₂, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 12 (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). De forma similar, cuando se hace referencia a alquilo C₁₋₆, se entiende que el grupo alquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 1 y 6 (por ejemplo, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆).

45 El término "cicloalquilo" incluye grupos cicloalquilo, policicloalquilo y cicloalqueno, así como combinaciones de estos con grupos alquilo, tales como grupos cicloalquilalquilo. El grupo cicloalquilo puede interrumpirse con 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de -O-, -NH- o -S-. Sin embargo, el término "cicloalquilo" se refiere habitualmente a grupos cicloalquilo que no tienen interrupciones de heteroátomos. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen grupos ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilmetilo y adamantilo. Cuando se hace referencia a cicloalquilo C₃₋₁₂, se entiende que el grupo cicloalquilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 3 y 12 (por ejemplo, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

55 El término "arilo" se refiere a un grupo aromático, tal como fenilo o naftilo. Cuando se hace referencia a arilo C₅₋₁₂, se entiende que el grupo arilo puede contener cualquier número de átomos de carbono entre 5 y 12 (por ejemplo, C₅,

C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

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

Los grupos protectores de nitrógeno incluyen grupos sililo (tales como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acilo (tales como ftalimidas, trifluoroacetamidas, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, t-butoxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Z o Cbz), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), 2-(trimetilsilil)etoxi carbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (tales como β-trimetilsililetanosulfonilo (SES)), derivados de sulfenilo, alquilo C₁₋₁₂, bencilo, benzhidrilo, tritilo, 9-fenilfluorenilo, etc. Un grupo protector de nitrógeno preferido es Fmoc.

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

Se apreciará que pueden existir anillos de azúcares en forma abierta y cerrada y que, aunque se muestran formas cerradas en las fórmulas estructurales del presente documento, las formas abiertas también están abarcadas por la invención.

Pueden prepararse polipéptidos de la invención por diversos medios (por ejemplo, expresión recombinante, purificación de cultivo celular, síntesis química (al menos en parte), etc.) y en diversas formas (por ejemplo, nativa, fusiones, no glicosilada, lipidada, etc.). Se preparan preferentemente en forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente sin otras proteínas de *N. meningitidis* o célula huésped). Aunque la expresión del polipéptido puede tener lugar en *Neisseria*, se prefiere un huésped heterólogo. El huésped heterólogo puede ser procarionota (por ejemplo, una bacteria) o eucariota. Es preferentemente *E. coli*, pero otros huéspedes adecuados incluyen *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (por ejemplo, *M. tuberculosis*), levadura, etc.

Puede prepararse ácido nucleico de acuerdo con la invención de muchas maneras (por ejemplo, por síntesis química (al menos en parte), de bibliotecas genómicas o de ADNc, del organismo en sí mismo, etc.) y puede tomar diversas formas (por ejemplo, monocatenaria, bicatenaria, vectores, sondas, etc.). Preferentemente se preparan en forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente sin otros ácidos nucleicos de *N. meningitidis* o la célula huésped). El término "ácido nucleico" incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tales como los que contienen cadenas principales modificadas (por ejemplo, fosforotioatos, etc.), y también ácidos péptido nucleicos (PNA) etc. La invención incluye ácido nucleico que comprende secuencias complementarias de las descritas anteriormente (por ejemplo para fines de exploración o antisentido).

Después del serogrupo, la clasificación meningocócica incluye serotipo, serosubtipo y después inmunotipo, y la nomenclatura convencional enumera serogrupo, serotipo, serosubtipo e inmunotipo, cada uno separado por dos puntos, por ejemplo B:4:P1.15:L3,7,9. Dentro del serogrupo B, algunos linajes provocan enfermedad con frecuencia (hiperinvasivos), algunos linajes provocan formas más graves de la enfermedad que otros (hipervirulentos) y otros apenas provocan enfermedad en absoluto. Se reconocen siete linajes hipervirulentos, concretamente los subgrupos I, III y IV-1, complejo ET-5, complejo ET-37, grupo A4 y linaje 3. Estos se han definido por electroforesis enzimática multilocus (MLEE), pero también se ha usado tipificación multilocus de secuencia (MLST) para clasificar meningococos [ref. 104].

Modos para llevar a cabo la invención

Proteína híbrida ΔG287-953

Se digirió ADN que codificaba proteína 287 de la cepa 394/98 del serogrupo B meningocócico y proteína 953 de la cepa 2996 del serogrupo B meningocócico y se ligó, junto con una secuencia de engarce corta, para proporcionar un plásmido que codificara la secuencia de aminoácidos SEC ID 7. El plásmido se usó para transfectar *E. coli* y se cultivaron bacterias para expresar la proteína. Después de crecimiento adecuado, se recogieron las bacterias y se purificó la proteína. A partir del cultivo, las bacterias se centrifugaron y el sedimento se homogeneizó en presencia de tampón acetato 50 mM (pH 5) con una relación de volumen de sedimento:tampón de 1:8. Se realizó lisis usando un homogeneizador de alta presión (AVESTIN, 4 ciclos a 96,50 MPa). Después de la lisis, se añadió urea a una concentración final de 5 M, seguido de agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. El pH se redujo de 6 a 5 usando tampón acetato 200 mM (pH 4) + urea 5 M. La mezcla se centrifugó a 16800 g durante 60 minutos a 2-8 °C. El sobrenadante se recogió y se filtró por SARTOBRAN P (SARTORIUS 0,45-0,22 μm). La proteína en el sobrenadante filtrado fue estable durante al menos 30 días a -20 °C y durante al menos 15 días a 2-8 °C.

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

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

El material eluido filtrado de la columna Q HP se diluyó 1:2 usando PBS pH 7,0 (NaCl 150 mM + fosfato potásico 10 mM, pH 7,00) y después se diafiltró frente a 10 volúmenes de PBS pH 7,0 por ultrafiltración tangencial. Al final de la diafiltración el material se concentró 1,6 veces hasta aproximadamente 1,2 mg/ml de proteínas totales. Usando una membrana de punto de corte 30.000 Da (membrana de celulosa regenerada de 50 cm², Millipore PLCTK 30) fue posible dializar el material con un rendimiento de aproximadamente el 90%.

Proteína híbrida 936 -ΔG741

Se digirió ADN que codificaba la proteína 936 de la cepa 2996 del serogrupo B meningocócico y proteína 741 de la cepa MC58 del serogrupo B meningocócico y se ligó, junto con una secuencia de engarce corta, para proporcionar un plásmido que codificara la secuencia de aminoácidos SEC ID 8. El plásmido se usó para transfectar *E. coli* y las bacterias se cultivaron para expresar la proteína. La proteína recombinante no se secretó, sino que permaneció soluble dentro de las bacterias.

Después de un crecimiento adecuado, las bacterias se centrifugaron para proporcionar una pasta húmeda y se trataron como sigue:

- Homogeneización por sistema de alta presión en presencia de fosfato sódico 20 mM pH 7,00.
- Centrifugación y clarificación por filtración ortogonal.
- Cromatografía en columna catiónica (Flujo Rápido de SP Sepharose), con elución por NaCl 150 mM en fosfato sódico 20 mM pH 7,00.
- Cromatografía en columna aniónica (Q Sepharose XL) con recogida de flujo continuo.
- Cromatografía en columna hidrófoba (Flujo Rápido de Fenil Sepharose 6 Sub Alto) con elución por fosfato sódico 20 mM, pH 7,00.
- Diafiltración frente a PBS pH 7,4 con un punto de corte de 10 Kd.
- Filtración esterilizante final y almacenamiento a -20 °C

La proteína en el material final fue estable durante al menos 3 meses tanto a -20 °C como a 2-8 °C.

Proteína NadA^{(NL)(C)}

Se digirió ADN que codificaba la proteína NadA de la cepa 2996 del serogrupo B meningocócico para retirar la secuencia que codificaba su extremo C terminal, para proporcionar un plásmido que codificara la secuencia de aminoácidos SEC ID 1. El plásmido se usó para transfectar *E. coli* y las bacterias se cultivaron para expresar la proteína. La proteína recombinante se secretó al medio de cultivo, y el péptido líder estaba ausente en la proteína secretada (SEC ID 2). El sobrenadante se trató como sigue:

- Concentración 7X y diafiltración frente a tampón TRIS/HCl 20 mM pH 7,6 por UF de flujo cruzado (punto de corte 30 Kd).
- Cromatografía en columna aniónica (Q Sepharose XL), con elución por NaCl 400 mM en TRIS/HCl 20 mM pH 7,6.
- Etapa de cromatografía en columna hidrófoba (Flujo Rápido de Fenil Sepharose 6 Sub Alto), con elución por NaCl 50 mM en TRIS/HCl pH 7,6.
- Cromatografía en columna cerámica de hidroxiapatita (HA Macro. Prep) con elución por fosfato sódico 200 mM pH 7,4.
- Diafiltración (punto de corte 30 Kd) frente a PBS pH 7,4
- Filtración esterilizante final y almacenamiento a -20 °C

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

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

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

Combinaciones antigénicas

Se inmunizaron ratones con una composición que comprendía las tres proteínas y, para fines de comparación, las tres proteínas también se ensayaron de forma individual. Se usaron diez ratones por grupo. La mezcla fue capaz de inducir altos títulos bactericidas frente a diversas cepas:

55

Cepa meningocócica (Serogrupo)								
	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38	394/98 ^(B)	H44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)	C11 ^(C)
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000
(2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4
(3)	32000	8000	—	—	—	8000	—	32000
Mezcla	32000	32000	65000	16000	260000	65000	>65000	8000
“-” indica que esta cepa no contiene gen de NadA								

Observando ratones individuales, la mezcla triple indujo títulos bactericidas altos y uniformes frente a las tres cepas de serogrupo B de las que derivan los antígenos individuales:

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

Combinación y comparación con OMV

- 5 En experimentos adicionales, los antígenos (20 µg de cada antígeno por dosis) se administraron en combinación con 10 µg de OMV preparados a partir de la cepa H44/76 (Noruega) o cepa 394/98 (Nueva Zelanda). Los controles positivos fueron el mAb anti SEAM-3 capsular para el serogrupo B o sacáridos capsulares conjugados con CRM197 para otras cepas. La mezcla casi siempre proporcionó mejores títulos que OMV sencillos, y la adición de la mezcla a los OMV casi siempre potenció significativamente la eficacia de los OMV. En muchos casos la mezcla de antígenos alcanzó o superó la respuesta vista con el control positivo.

Ensayos de linajes hipervirulentos

Los siguientes antígenos se ensayaron frente a una diversidad de cepas de serogrupo B a partir de una diversidad de linajes hipervirulentos:

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

Se usó SEAM-3 como un control positivo.

- 25 Los resultados fueron como sigue, expresados como el porcentaje de cepas en el linaje hipervirulento indicado en el que el título bactericida en suero superó 1024:

	número de cepas	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	S-3
A4	4	50	50	0	100	25	25	25	100	100	+
ET-5	8	25	75	88	100	71	14	71	100	100	+
Linaje 3	13	0	75	15	93	8	85	8	92	93	+
ET-37	4	11	22	0	33	0	0	0	22	25	+

Frente a cepas de referencia particulares, los títulos bactericidas fueron como sigue:

	Cepa	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	S-3
A4	961-5945	128	2048	<8	2048	262144	8192	262144	262144	4096	8192
ET-5	44/76	<4	2048	32768	131072	524288	8192	524288	524288	52428 8	16384
Linaje 3	394/98	<4	1024	32	4096	<4	16384	256	16384	16384	16384
ET-37	LPN17592	2048	1024	256	4096	<8	<8	512	16384	65536	1024

Las composiciones (d), (h) e (i) inducen por lo tanto respuestas de anticuerpos bactericidas frente a una amplia diversidad de cepas de meningococos del serogrupo B dentro de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3. Los títulos usando las composiciones (h) e (i) fueron generalmente mayores que con (d), pero la cobertura de cepas dentro de los linajes hipervirulentos A4, ET-5 y linaje 3 no fueron mejores.

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

Combinación con conjugados meningocócicos y/o Hib

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

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

10 Se prepara una vacuna similar, que incluye conjugado de MenA (10 µg de sacárido + 12,5-33 µg de CRM₁₉₇) y/o un conjugado de HbOC Hib (10 µg de sacárido + 2-5 µg de CRM₁₉₇).

15 En una serie de ensayos, se combinaron conjugados de los serogrupos C, W135 y Y, con cada conjugado presente a 40 µg/ml (medido como sacárido). Para almacenaje antes de su uso con antígenos de MenB los conjugados combinados se liofilizaron [-45 °C durante 3 horas, -35 °C durante 20 horas a vacío de 6,65 Pa, 30 °C durante 10 horas a 6,65 Pa, 30 °C durante 9 horas a 16,63 Pa] en presencia de 15 mg de sacarosa, tampón fosfato 10 mM (pH 7,2). El volumen final antes de la liofilización fue de 0,3 ml. Después de resuspensión en 0,6 ml de solución acuosa, por lo tanto, los sacáridos estaban presentes a 12 µg por serogrupo. La liofilización se usó solamente por conveniencia, y ni la eficacia ni la estabilidad durante el almacenamiento normal del producto final requieren liofilización.

20 Se preparó un segundo lote de material de la misma manera, pero incluyendo también el conjugado del serogrupo A en la misma dosificación de sacáridos que para los serogrupos C, W135 y Y.

Se preparó un tercer lote de material de la misma manera (serogrupos A, C, W135 y Y), pero incluyendo también un conjugado de Hib-CRM₁₉₇ a la misma dosificación de sacáridos que para los meningococos.

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

Estos materiales se combinaron con 600 µl de la mezcla de serogrupo (d) (o, como un control, es decir grupos 2 y 3, en una composición idéntica pero sin los antígenos), para proporcionar ocho composiciones:

Componentes	1	2	3	4	5	6	7	8
NadA ^{(NL)(C)} µg/dosis	20			20	20	20	20	20
936-741 µg/dosis	20			20	20	20	20	20
287-953 µg/dosis	20			20	20	20	20	20
MenA-CRM µg/dosis*		2,4	2,4	2,4			2,4	2,4
MenC-CRM µg/dosis*		2,4	2,4		2,4	2,4	2,4	2,4
MenW-CRM µg/dosis*		2,4	2,4			2,4	2,4	2,4
MenY-CRM µg/dosis*		2,4	2,4			2,4	2,4	2,4
Hib-CRM µg/dosis*			2,4					2,4

ES 2 397 923 T3

(continuación)

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

Estas composiciones se administraron por vía intraperitoneal en un volumen de 200 μ l a ratones CD/1 (8 por grupo) los días 0, 21 y 35, con una extracción de sangre final el día 49. El día 49 se ensayaron los sueros en ensayos de SBA frente a una diversidad de cepas meningocócicas en los serogrupos A, B, C, W135 y Y. Los resultados fueron:

Grupo	B			A			C				W135 LPN17592	Y 860800
	2996	MC58	394/98	44/76	F6124	C11	312294	C4678	M1569			
1	1024	4096	1024	8192	2048	2048	<16*	64*	128*	512	65536	
2	<4	<4	128	<16	4096	8192	-	-	-	32	32768	
3	<4	<4	<4	<16	4096	16384	-	-	-	512	32768	
4	64	4096	512	8192	8192	128	-	-	-	256	32768	
5	256	4096	1024	8192	256	8192	>8192	>8192	>8192	512	32768	
6	128	1024	256	8192	128	8192	8192	>8192	>8192	512	16384	
7	256	512	512	16384	1024	8192	4096	>8192	>8192	1024	16384	
8	256	2048	512	8192	1024	8192	2048	>8192	>8192	512	32768	

Por lo tanto los antígenos proteicos meningocócicos siguen siendo eficaces incluso después de la adición de los antígenos sacáridos meningocócicos y de Hib conjugados. De forma similar, los conjugados meningocócicos conservan la eficacia incluso después de la adición de los antígenos proteicos. De hecho, los datos sugieren que la adición de los antígenos proteicos a los conjugados potencia la eficacia anti-MenW135 (comparar grupos 2 y 7).

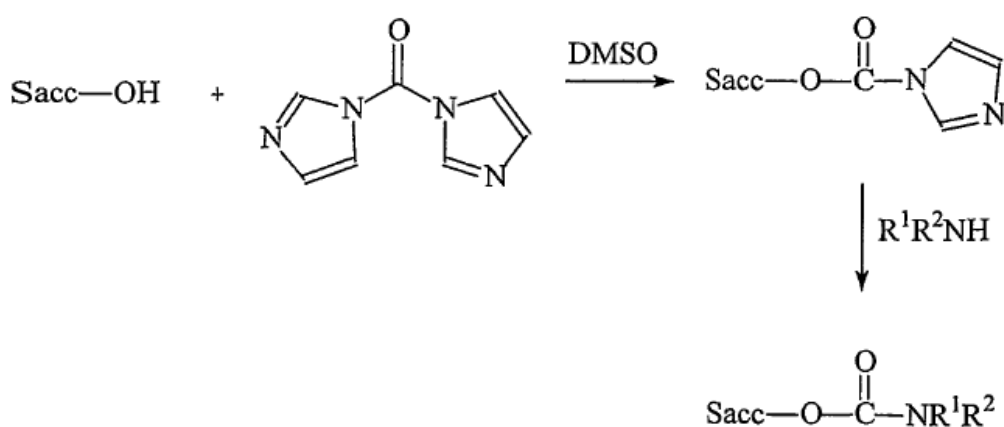
5 Además, hay un nivel de reactividad cruzada, en particular para el serogrupo Y, ya que los antígenos proteicos solos proporcionan un buen título anti-MenY [consultese referencia 220], al igual que los grupos 4 y 5.

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

Uso de sacárido MenA modificado

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

El oligosacárido se activó usando el siguiente esquema de reacción:



15 Sacc = resto de sacárido

El oligosacárido se disolvió en DMSO para proporcionar una concentración de sacárido de 10 mg/ml. De acuerdo con una relación molar de oligosacáridos:CDI que es 1:20, se añadieron después 21,262 g de CDI y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El compuesto de MenA-CDI resultante se purificó por precipitación selectiva en una mezcla de acetona:DMSO 80:20 (v/v) seguido de centrifugación. Se calculó que la eficacia de la reacción de activación era de aproximadamente 67,9% determinando la relación de imidazol libre e imidazol unido.

20

En la segunda etapa de reacción, el oligosacárido MenA-CDI se solubilizó en DMSO a una concentración de sacárido de aproximadamente 10 mg/ml. De acuerdo con una relación molar de unidad de MenA-CDI:DMA que es de 1:100, se añadieron 36,288 g de clorhidrato de dimetilamina al 99% (es decir R¹ y R² = Me) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El producto de reacción se liofilizó y se volvió a solubilizar en solución de agua 10 mg/ml.

25

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

30

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

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

35

- hidrólisis del polisacárido para proporcionar fragmentos oligosacáridos
- selección por tamaño de los fragmentos oligosacáridos
- aminación reductora de grupos aldehído terminales en los oligosacáridos seleccionados por tamaño
- protección de grupos -NH₂ terminales por grupos Fmoc antes de la reacción de CDI
- desprotección intrínseca de grupos -NH₂ durante la reacción de DMA
- activación de grupos -NN₂ terminales por SIDEA (ácido N-hidroxisuccinimida adípico)

40

- unión covalente con proteína CRM₁₉₇

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

5

El conjugado de MenA modificado se combina con conjugados de MenC, MenW135 y MenY como un sustituto para el conjugado de oligosacárido no modificado. Esta mezcla tetravalente se mezcla con los tres polipéptidos de MenB para proporcionar una vacuna eficaz contra los serogrupos A, B, C, W135 y Y de *N. meningitidis* en una dosis única.

10 **Combinaciones neumocócicas**

Las tres proteínas de MenB combinadas se mezclan con conjugados de sacáridos neumocócicos para proporcionar una concentración final de 2 µg/dosis de cada uno de los serotipos neumocócicos (doble para el serotipo 6B). La vacuna reconstituida contiene por lo tanto los siguientes antígenos:

Componente	Cantidad por cada 0,5 ml de dosis
Conjugado de serogrupo A	5 µg de sacárido + 6,25-16,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo C	5 µg de sacárido + 6,25-12,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo W135	5 µg de sacárido + 3,3-10µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serogrupo Y	5 µg de sacárido + 3,3-10 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo 4 de neumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo 9V de neumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo 14 de neumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo 18C de neumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo 19F de neumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo 23F de neumococo	2 µg de sacárido + 2,5 µg de CRM ₁₉₇
Conjugado de serotipo 6B de neumococo	4 µg de sacárido + 5 µg de CRM ₁₉₇

Referencias (el contenido de las cuales se incorpora en la presente por referencia)

15 [1] Darkes y Plosker (2002) Paediatr Drugs 4:609-630.
 [2] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2:47-49.
 [3] Armand y col. (1982) J. Biol. Stand 10:335-339.
 [4] Cadoz y col. (1985) Vaccine 3:340-342.
 [5] Baklaic y col. (1983) Infect. Immun. 42:599-604.
 20 [6] MMWR (1997) 46(RR-5) 1-10.
 [7] Bjune y col. (1991) lancet 338(8775):1093-96
 [8] Frash (1990) p.123-145 de Advances in Biotechnological Processes vol. 13 (eds. Mizrahi y Van Wezel)
 [9] Documento WO03/007985
 [10] Inzana (1987) Infect. Immun. 55:1573-1579.
 25 [11] Documento WO02/058737.
 [12] Solicitud de Patente de Reino Unido GB-0408978.5. [ref. de mandatario: P037501GB].
 [13] Kandil y col. (1997) Glycoconj J 14:13-17.
 [14] Berkin y col. (2002) Chemistry 8:4424-4433.
 [15] Glode y col. (1979) J Infect Dis 139:52-56
 30 [16] Documento WO94/05325; Patente de Estados Unidos 5.425.946.
 [17] Documento PCT/IB04/, presentado el 4 de octubre de 2004 que reivindica beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente de Reino Unido GB-0323103.2.
 [18] Documento WO03/080678.
 [19] Nilsson y Svensson (1979) Carbohydrate Research 69: 292-296)
 35 [20] Ramsay y col. (2001) Lancet 357(9251):195-196.
 [21] Lindberg (1999) Vaccine 17 Supl 2:S28-36.
 [22] Buttery y Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-168.

- [23] Ahmad y Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
 [24] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
 [25] Patente Europea 0477508.
 [26] Patente de Estados Unidos 5.306.492.
 5 [27] Documento WO98/42721.
 [28] *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114.
 [29] Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 o 012342335X.
 [30] Anónimo (enero 2002) *Research Disclosure*, 453077.
 [31] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
 10 [32] Anderson y col. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
 [33] Documento EP-A-0372501.
 [34] Documento EP-A-0378881.
 [35] Documento EP-A-0427347.
 [36] Documento WO93/17712
 15 [37] Documento WO94/03208.
 [38] Documento WO98/58668.
 [39] Documento EP-A-0471177.
 [40] Documento WO91/01146
 [41] Falugi y col. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
 20 [42] Baraldo y col., (2004) *Infect Immun.* 72:4884-7
 [43] Documento EP-A-0594610.
 [44] Documento WO00/56360.
 [45] Kuo y col. (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
 [46] Documento WO02/091998.
 25 [47] Documento WO01/7233.
 [48] Documento WO00/61761.
 [49] Documento W02004/083251.
 [50] Documento WO99/4213
 [51] Documento WO96/40
 30 [52] Lees y col. (1996) *Vaccine* 14:190-198.
 [53] Documento WO95/08348.
 [54] Patente de Estados Unidos 4.882.317
 [55] Patente de Estados Unidos 4.695.624
 [56] Porro y col. (1985) *Mol Immunol* 22:907-919.
 35 [57] Documento EP-A-0208375
 [58] Documento WO00/10599
 [59] Gever y col. *Med. Microbiol. Immunol.* 165:171-288 (1979).
 [60] Patente de Estados Unidos 4.057.685.
 [61] Patentes de Estados Unidos 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
 40 [62] Patente de Estados Unidos 4.459.286.
 [63] Patente de Estados Unidos 4.965.338
 [64] Patente de Estados Unidos 4.663.160.
 [65] Patente de Estados Unidos 4.761.283
 [66] Patente de Estados Unidos 4.356.170
 45 [67] Lei y col. (2000) *Dev Biol (Basilea)* 103:259-264.
 [68] Documento WO00/38711; Patente de Estados Unidos 6.146.902.
 [69] Lamb y col. (2000) *Dev Biol (Basilea)* 103:251-258.
 [70] Lamb y col. (2000) *Journal of Chromatography A* 894:311-318.
 [71] D'Ambra y col. (2000) *Dev Biol (Basilea)* 103:241-242.
 50 [72] Ravenscroft y col. (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
 [73] Costantino y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
 [74] Parkhill y col. (2000) *Nature* 404:502-506.
 [75] Tettelin y col. (2000) *Science* 287:1809-1815.
 [76] Documento WO00/66791.
 55 [77] Pizza y col. (2000) *Science* 287:1816-1820.
 [78] Documento WO99/24578.
 [79] Documento WO99/36544.
 [80] Documento WO99/57280.
 [81] Documento WO00/22430.
 60 [82] Documento WO00/66741.
 [83] Documento WO01/64920.
 [84] Documento WO01/64922.
 [85] Documento WO03/020756.
 [86] Documento WO2004/014419.
 65 [87] Documento WO99/31132; Patente de Estados Unidos 6.495.345.
 [88] Documento WO99/58683.

- [89] Peak y col. (2000) FEMS Immunol Med Microbiol 28:329-334.
 [90] Documento WO93/06861.
 [91] Documento EP-A-0586266.
 [92] Documento WO92/03467.
 5 [93] Patente de Estados Unidos 5912336.
 [94] Documento WO2004/015099.
 [95] Documento WO2004/014418.
 [96] Solicitudes de Patente de Reino Unido 0223741.0, 0305831.0 y 0309115.4; y Documento WO2004/032958.
 [97] Comanducci y col. (2002) J. Exp. Med 195:1445-1454.
 10 [98] Documento WO03/010194.
 [99] Documento WO2004/048404
 [100] Documento WO03/063766.
 [101] Masignani y col. (2003) J Exp Med 197:789-799.
 [102] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
 15 [103] Pettersson y col. (1994) Microb Pathog 17(6):395-408.
 [104] Maiden y col. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
 [105] Welsch y col. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Instituto Noruego de Salud Pública, Oslo, Noruega; 1-6 de septiembre de 2002. *Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C Neisseria meningitidis strains.*
 20 [106] Santos y col. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Instituto Noruego de Salud Pública, Oslo, Noruega; Oslo, Noruega; 1-6 de septiembre de 2002. *Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of N. meningitidis.*
 [107] Documento WO96/14086.
 25 [108] Vaccines (eds. Plotkin y Mortimer), 1988. ISBN: 0-7216-1946-0
 [109] Gustafsson y col. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
 [110] Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9:232-238.
 [111] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188.
 [112] Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.
 30 [113] Gerlich y col. (1990) Vaccine 8 Supl: S63-68 y 79-80.
 [114] Documento WO93/24148.
 [115] Sutter y col. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308.
 [116] Zimmerman y Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126.
 [117] Charalambous y Feavers (2001) J Med Microbiol 50:937-939.
 35 [118] Westerink (2001) Int Rev Immunol 20:251-261.
 [119] Grothaus y col. (2000) Vaccine 18:1253-1263.
 [120] Kanra y col. (1999) The Turkish Journal of Paediatrics 42:421-427.
 [121] Ravenscroft y col. (2000) Dev Biol (Basilea) 103: 35-47.
 [122] Documento WO97/00697.
 40 [123] Documento WO02/00249.
 [124] Documento WO96/37222; Patente de Estados Unidos 6.333.036.
 [125] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
 [126] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285, v.
 [127] Jedrzejewski (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
 45 [128] Zielen y col. (2000) Infect. Immun. 68:1435-1440.
 [129] Tettelin y col. (2001) Science 293:498-506.
 [130] Hoskins y col. (2001) J Bacteriol 183:5709-5717.
 [131] Rappuoli (2000) Curr Opin Microbiol 3:445-450
 [132] Rappuoli (2001) Vaccine 19:2688-2691.
 50 [133] Masignani y col. (2002) Expert Opin Biol Ther 2:895-905.
 [134] Mora y col. (2003) Drug Discov Today 8:459-464.
 [135] Wizemann y col. (2001) Infect Immun 69:1593-1598.
 [136] Rigden y col. (2003) Crit Rev Biochem Mol Biol 38:143-168.
 [137] Documento WO02/22167.
 55 [138] Paoletti y col. (2001) Vaccines 19:2118-2126.
 [139] Documento WO00/56365.
 [140] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 [141] Documento WO03/009869.
 [142] Vaccine Design... (1995) eds. Powell y Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
 60 [143] Documento WO00/23105.
 [144] Documento WO90/14837.
 [145] Patente de Estados Unidos 5.057.540.
 [146] Documento WO96/33739.
 [147] Documento EP-A-0109942.
 65 [148] Documento WO96/11711.
 [149] Documento WO00/07621.

- [150] Barr y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [151] Sjolanderet y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [152] Niil:ura y col. (2002) *Virology* 293:273-280.
- [153] Lenz y col. (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- 5 [154] Pinto y col. (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [155] Gerber y col. (2001) *Virology* 75:4752-4760.
- [156] Documento WO03/024480
- [157] Documento WO03/024481
- [158] Gluck y col. (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- 10 [159] Documento EP-A-0689454.
- [160] Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [161] Evans y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [162] Meraldi y col. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [163] Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- 15 [164] Kandimalla y col. (2003) *NucleicAcids Research* 31:2393-2400.
- [165] Documento WO02/26757.
- [166] Documento WO99/62923.
- [167] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [168] McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- 20 [169] Documento WO98/40100
- [170] Patente de Estados Unidos 6.207.646.
- [171] Patente de Estados Unidos 6.239.116.
- [172] Patente de Estados Unidos 6.429.199.
- [173] Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- 25 [174] Blackwell y col. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [175] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [176] Documento WO01/95935.
- [177] Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [178] Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- 30 [179] Documento WO03/035836.
- [180] Documento WO95/17211.
- [181] Documento WO98/42375.
- [182] Beignon y col. (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [183] Pizza y col. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- 35 [184] Pizza y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [185] Scharton-Kersten y col. (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [186] Ryan y col. (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [187] Partidos y col. (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [188] Peppoloni y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- 40 [189] Pine y col. (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [190] Domenighini y col. (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [191] Documento WO99/40936.
- [192] Documento WO99/44636.
- [193] Singh y col. (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- 45 [194] Documento WO99/27960.
- [195] Patente de Estados Unidos 6.090.406
- [196] Patente de Estados Unidos 5.916.588
- [197] Documento EP-A-0626169.
- [198] Documento WO99/52549.
- 50 [199] Documento WO01/2120
- [200] Documento WO01/21152.
- [201] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [202] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [203] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- 55 [204] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [205] Documento WO99/11241.
- [206] Documento WO94/00153.
- [207] Documento WO98/57659.
- [208] Solicitudes de Patente Europea 0835318, 0735898 y 0761231.
- 60 [209] Documento WO01/30390.
- [210] Almeida y Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- [211] Agarwal y Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.
- [212] Documento WO00/53221.
- [213] Jakobsen y col. (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.
- 65 [214] Wu y col. (1997) *J Infect Dis* 175:839-846.
- [215] Bergquist y col. (1998) *APMIS* 106:800-806.

- [216] Baudner y col. (2002) Infect Immun 70:4785-4790.
 [217] Ugozzoli y col. (2002) J Infect Dis 186:1358-1361.
 [218] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1987) Suplemento 30
 [219] Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.
 [220] Solicitud de Patente de Reino Unido 0408977.7. [ref. de mandatario: P037500GB].

5

LISTADO DE SECUENCIAS

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

MKHFPKVLTTAILATFCSGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAA
 DVEADDFKGLGLKVVNTLTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGE
 NITTFEETKTNIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVK
 AAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADVTTREESDSKFVRI DGLNATTE
 KLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDKTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVG

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

ATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKVVNTLTKTV
 NENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFEETKTNIVKIDKLEAV
 ADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKA
 EAAVAAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADVTTREESDSKFVRI DGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGL
 DKTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVG

SEC ID 3 - ΔG741 de la cepa MC58

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRO
 IEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGT
 AFGSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKSPLELVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGG
 KAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

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

VSAVIGSAAVGAASVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHHLLLGQVATEG
 EKQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGIL
 TPPEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQR

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

ATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPIANLQSGSQHFTDHLKSADIFDA
 AQYPDIRFVSTKFNFGKLVSDGNLTMHGKTAPVKLKAEFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGMDYL
 VNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ

SEC ID 6 - ΔG287 de la cepa MC58

SPDVKSADTLSPAPVSEKETEAKEDAPQAGSQGQAPSQAQGSQDMAAVSEENTGNGGAVTADNPKNEDEVA
 QNDMPQNAAGTDSSTPNHTPDPNMLAGNMENQATDAGES SQPANQPDMAAADGMQGDPSAGGQONAGNTAAQG
 ANQAGNNQAAGSSDPI PASNPAPANGGSNFRVLDLANGVLIDGPSQNI TLTHCKGDCSGNNFLDEEVQLKSEF
 EKLSADAKISNYKDKGNDKFVGLVADSVQMGINQYII FYKPKPTS FARFRRSARSRRSLPAEMPLI PVNQAD
 TLIVDGEAVSLTGHSNIFAPEGNYRYLYGAEKLPGGSYALRVQGEPAKGEMLAGAAVYNGEVLHFHTENGRP
 YPTRGRFAAKVDFGSKSVDGII DSGDDLHMGTKQKFAAIDGNGFKGTWTENGSGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSY
 RPTDAEKGGFGVFAGKKEQD

SEC ID 7 - híbrido 287-953

MASPDVKSADTLSPAPVSEKETEAKEDAPQAGSQGAPSAQGGQDMAAVSEENTGNGGAAATDKPKNEDE
 GAQNMPQNAADTSLTPNHTPASNMPAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMAANTADGMQGGDPSSAGGENAGNTAA
 QGTNQAENNTAGSQNPASSTNPSATNSGGDFGRNTVGNVSVVIDGPSQNTLTHCKGSDSCSGNNFLDEEVQLKS
 EFEKLSADAKISNYKKDGKNDGKNDKFLVGLVADSVQMGINQYII FYKPKPSTSFARFRRSARSRRSLPAEMPLI
 PVNQADTLIVDGEAVSLTGHSNIFAPEGNRYRLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPSKGEMLAGTAVYNGEVLHFFH
 TENGRPSPSRGRFAAKVDFGSKSVDDGIIDSGDGLHMGTKFKAAIDGNGFKGTWTENGDDVSGKFYGPAGEEV
 AGKYSYRPTDAEKGFGVFAGKKEQDGSGGGGATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKR
 DGKIDITIPVANLQSGSQHFTDHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNKGLVSVVDGNLTMHGKTAPVKLKAEK
 FNCYQSPMAKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ*

SEC ID 8 - híbrido 936-741

MVSAVIGSAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMLRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATE
 GEKQFVQGIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVYVMI
 LTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVTILYQNYVQRGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKN
 EKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQEQIQDS
 EHSKGMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQNGKIEHLKSPELNV
 DLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ*

SEC ID 9 - engarce

GSGGGG

SEC ID 10 - secuencia 741

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVS
 RFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQEQIQDSEHSKGMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEGG
 RATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKSY
 SLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEC ID 11 - secuencia 741

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVS
 RFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVAVLQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGK
 AEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYH
 LALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEC ID 12 - secuencia 741

CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTG
 KLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTA
 FNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYG
 SEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica acuosa que, después de su administración a un sujeto, es capaz de inducir una respuesta inmune que es bactericida frente a los serogrupos B, C, W135 y Y de *N. meningitidis*, comprendiendo la composición: (i) un antígeno sacárido capsular del serogrupo C conjugado; (ii) un antígeno sacárido capsular del serogrupo W135 conjugado; (iii) un antígeno sacárido capsular del serogrupo Y conjugado; y (iv) una proteína "NadA" en forma oligomérica, una proteína "741", una proteína "936", una proteína "953" y una proteína "287", en la que:
- la NadA tiene una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene 50% o más de identidad con SEC ID N°: 2; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 7 aminoácidos consecutivos de SEC ID N°: 1 y que comprende un epítipo de SEC ID N°: 1;
- la 741 tiene una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene 50% o más de identidad con SEC ID N°: 3; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 7 aminoácidos consecutivos de SEC ID N°: 3 y que comprende un epítipo de SEC ID N°: 3;
- la 936 tiene una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene 50% o más de identidad con SEC ID N°: 4; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 7 aminoácidos consecutivos de SEC ID N°: 4 y que comprende un epítipo de SEC ID N°: 4;
- la 953 tiene una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene 50% o más de identidad con SEC ID N°: 5; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 7 aminoácidos consecutivos de SEC ID N°: 5 y que comprende un epítipo de SEC ID N°: 5;
- la 287 tiene una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene 50% o más de identidad con SEC ID N°: 6; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 7 aminoácidos consecutivos de SEC ID N°: 6 y que comprende un epítipo de SEC ID N°: 6; y uno o más de los antígenos sacáridos capsulares del serogrupo C, W135 y Y están O-acetilados.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende: un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 2; un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 7; y un tercer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 8.
3. La composición de la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende además: (v) un antígeno sacárido capsular del serogrupo A conjugado.
4. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que los sacáridos están conjugados con una proteína portadora seleccionada de: toxoide diftérico, toxoide del tétanos, proteína D de *H. influenzae* y CRM₁₉₇.
5. La composición de cualquier reivindicación precedente, que comprende además un antígeno sacárido que protege frente a *H. influenzae* de tipo B (Hib).
6. La composición de cualquier reivindicación precedente, que comprende además un antígeno que protege contra *Streptococcus pneumoniae*.
7. La composición de cualquier reivindicación precedente, que comprende un adyuvante de fosfato de aluminio.
8. La composición de cualquier reivindicación precedente, envasada en un recipiente sellado herméticamente.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que el recipiente es un frasco o una jeringa.
10. La composición de cualquier reivindicación precedente, para su uso como un medicamento.
11. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos en un mamífero.