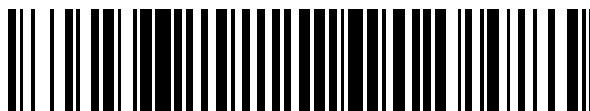


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 481**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2005** **E 05733998 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013** **EP 1737486**

54 Título: **Inmunización contra el serogrupo y del meningococo usando proteínas**

30 Prioridad:

22.04.2004 GB 0408977

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

22.04.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CONTORNI, MARIO;
GIULIANI, MARZIA y
PIZZA, MARIAGRAZIA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 401 481 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

Inmunización contra el serogrupo y del meningococo usando proteínas

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención está en los campos de inmunología y vacunología. En particular, se refiere a antígenos de *Neisseria meningitidis* (meningococo) y su uso en la inmunización.

10 TÉCNICA ANTERIOR

N. meningitidis es un patógeno humano Gram-negativo no móvil que coloniza la faringe y causa meningitis (y, ocasionalmente, septicemia en ausencia de meningitis). Causa trastornos endémicos y epidémicos. Después de la introducción de la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae*, *N. meningitidis* es la principal causa de meningitis bacteriana en los Estados Unidos de América.

15 En base al polisacárido capsular del organismo, se han identificado varios serogrupos de *N. meningitidis*. El serogrupo A es el patógeno que con más frecuencia está implicado en enfermedad epidémica en África subsahariana. Los serogrupos B y C son los responsables de la amplia variedad de casos en los Estados Unidos de América y en la mayoría de los países desarrollados. Los serogrupos W135 e Y son los responsables del resto de los casos en los Estados Unidos de América y países desarrollados. Después del serogrupo, la clasificación incluye el serotipo, serosubtipo y después el inmunotipo, y la nomenclatura estándar enumera el 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 causan a menudo enfermedad (hiperinvasivos), algunos linajes causan formas más severas de enfermedad que otras (hipervirulentos), y otros rara vez causan enfermedad. Se reconocen siete linajes hipervirulentos, concretamente los subgrupos I, II y IV-1, el complejo ET-5, el complejo ET-37, la agrupación A4 y el linaje 3. Estos se han reconocido por electroforesis de enzima multilocus (MLEE), pero también se ha usado la tipificación de secuencia multilocus (MLST) para clasificar meningococos [ref. 1].

30 Hasta la fecha, las vacunas contra el serogrupo A, C, W135 e Y han usado sus sacáridos capsulares como antígenos. Una vacuna polisacárida humana autorizada contra estos cuatro serogrupos se ha conocido durante muchos años [2,3]. Más recientemente, el enfoque ha permanecido sobre los sacáridos, pero la conjugación con proteínas portadoras. Las vacunas conjugadas contra el serogrupo C se han aprobado para uso humano, e incluyen Menjugate™ [4], Meningitec™ y NeisVac-C™. Las mezclas de conjugados de los serogrupos A+C son conocidos [5,6] y de los serogrupos A+C+W135+Y se han presentado [7,10].

35 El sacárido capsular del serogrupo B no puede usarse para vacunación porque es un autoantígeno en humanos. Los sacáridos del serogrupo químicamente modificado B se han presentado [11] pero no se han adoptado para uso clínico. Las vacunas basadas en las vesículas de membrana externa también se han probado [por ejemplo, véase la ref. 34], pero la protección proporcionada por estas vacunas típicamente se limita a la cepa usada para hacer la vacuna. Las secuencias del genoma para los serogrupos A [12] y B [13, 14] se han presentado, y la secuencia del serogrupo B se ha estudiado para identificar los antígenos de la vacuna [por ejemplo, refs. 15 a 20]. Los antígenos candidatos se han manipulado para mejorar la expresión heteróloga [refs. 21 a 23]

45 El dogma establecido para meningococo es por lo tanto que la inmunización contra los serogrupos A, C, W135 e Y se basará en cuatro sacáridos capsulares diferentes, y que la inmunización contra el serogrupo B no se basará en el sacárido capsular.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

50 A diferencia de este dogma, los inventores han descubierto que la inmunización contra los serogrupos A, C, W135 e Y (y contra el serogrupo Y en particular) puede conseguirse usando antígenos de polipéptido. Además, han descubierto que los polipéptidos del serogrupo B pueden conseguir esta protección, permitiendo de este modo una única vacuna con base de polipéptido que se usará para la protección contra todos los serogrupos A, B, C, W135 e Y.

55 De este modo la invención proporciona un método de inmunización de un sujeto contra la infección por el serogrupo Y de *Neisseria meningitidis*, que comprende la administración al sujeto de la composición como la definida en las reivindicaciones. Similarmente, la invención proporciona el uso de uno o más polipéptidos inmunogénicos en la fabricación de un medicamento para inmunizar un sujeto contra la infección por el serogrupo Y de *N.meningitidis*.

60 Las composiciones y usos son preferentemente para inmunizar un sujeto contra la infección por el serogrupo Y y también contra al menos uno de los serogrupos A, B, C y W135. Cuando un sujeto se inmuniza contra un serogrupo dado de meningococo entonces la composición preferentemente no incluye un sacárido capsular de ese serogrupo (bien conjugado o no conjugado). De este modo las composiciones preferentes no incluyen un sacárido capsular del serogrupo Y, y también pueden no incluir un sacárido capsular de los serogrupos A, B, C y/o W135.

Las composiciones para su uso de acuerdo con la invención pueden prepararse usando técnicas conocidas, tales como técnicas para preparar antígenos de polipéptidos meningocócicos desvelados en las referencias 15-24, o las técnicas conocidas para preparar OMVs desveladas en las referencias 34-38. El uso de antígenos de polipéptido purificado es preferente al uso de vesículas de membrana externa.

Las vacunas contra patógenos tales como el virus de la hepatitis B, difteria y tétano típicamente contienen un único antígeno de proteína (por ejemplo, el antígeno de proteína de VHB, o un toxoide tetánico). Por el contrario, las vacunas de tos ferina acelular típicamente contienen al menos tres proteínas B.pertussis y la vacuna neumocócica Prevenar™ contiene siete antígenos sacáridos conjugados separados. Otras vacunas tales como las vacunas de tos ferina celulares, la vacuna del sarampión y la vacuna de polio inactivada (VPI) y las vacunas OMV meningocócicas son por su propia naturaleza mezclas complejas de un gran número de antígenos. Aunque la protección puede obtenerse por un único antígeno, un pequeño número de antígenos definidos, o una mezcla compleja de antígenos indefinidos, depende por lo tanto de un número de factores.

El(los) polipéptido(s) inmunogénico(s)

La invención supone la administración de al menos un polipéptido inmunogénico a sujetos con el fin de proporcionar protección contra infección de *Neisseria meningitidis*. Estos polipéptidos inmunogénicos incluyen secuencias de aminoácido meningocócico, tales como secuencias de aminoácido encontradas en las cepas del serogrupo B, tales como la cepa secuenciada MC58 [13].

Puede usarse un pequeño número de antígenos definidos. Más que consistir en un único antígeno, es por lo tanto preferente que la composición de la invención comprenda una mezcla de 10 o menos (por ejemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) antígenos purificados, y es particularmente preferente que la composición no incluya mezclas complejas o indefinidas de antígenos, por ejemplo, es preferente no incluir vesículas de membrana externa en la composición.

Los polipéptidos inmunogénicos preferentes para su uso con la invención son aquellos desvelados en la referencia 24: (1) una proteína "NadA"; (2) una proteína "741"; (3) una proteína (936); (4) una proteína (953); y (5) una proteína "287". Estos antígenos se refieren en el presente documento como los "cinco antígenos básicos". La invención también puede usar 1, 2, 3, 4 o los 5 de estos antígenos, siempre y cuando al menos se use uno de NadA, "741" y "287".

Proteína NadA

"NadA" (adhesina A de *Neisseria*) del serogrupo B de *N. meningitidis* se desvela como proteína "961" en la referencia 17 (SEC IDs 2943 & 2944) y como "NMB1994" en la referencia 13 (véase también los números de acceso de GenBank: 11352904 & 7227256). Una descripción detallada de la proteína puede encontrarse en la referencia 25. No se vio proteína correspondiente en el genoma del serogrupo A [2, 25], pero se han presentado cepas del serogrupo A NadA+ desde [25].

Cuando se usó de acuerdo con la presente invención, NadA puede tomar diferentes formas. Las formas preferentes de NadA son las variantes de truncamiento o supresión, tales como las desveladas en las referencias 21 a 23. En particular, NadA sin su ancla a la membrana de terminal C es preferente (por ejemplo, la supresión de residuos 351-405 para la cepa 2996 (SEQ ID NO: 1), que algunas veces 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 la membrana (por ejemplo, SEC ID NO: 1) en *E. coli* da como resultado la secreción de la proteína en el sobrenadante del cultivo con la simultanea eliminación de su péptido líder 23mer (por ejemplo, dejar un 327mer para la cepa 2996 [SEQ ID NO: 2]). Los polipéptidos sin sus péptidos líderes algunas veces se distinguen en el presente documento mediante el uso de un superíndice "NL", por ejemplo NadA^(NL) o NadA^{(C)(NL)}.

Las secuencias preferentes de NadA tienen un 80% o más identidad (por ejemplo, 90%, 95%, 99% o más) con la SEQ ID NO: 2. Esto incluye las variantes de NadA (por ejemplo, variantes alélicas, homólogas, ortólogas, parálogas, mutantes, etc.). Las formas alélicas de NadA se muestran en la Figura 9 de la referencia 26.

Otras secuencias de NadA preferentes comprenden al menos *n* aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, en los que *n* es 20 o más (por ejemplo, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferentes comprenden un epítopo de NadA. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) de la C-terminal y/o la T-terminal de SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, NadA^(C), NadA^(NL), NadA^{(C)(NL)}). Donde se suprimen los residuos de N-terminal, es preferente que la supresión no elimine la habilidad de NadA para adherirse a las células epiteliales humanas. Un fragmento preferente de SEQ ID NO: 1 es la SEQ ID NO: 2.

NadA se usa preferentemente en una forma oligomérica (por ejemplo, en forma trimérica).

Proteína 741

La proteína "741" del serogrupo B se desvela en la referencia 17 (SEQ IDs 2535 & 2536) y como "NMB1870" en la referencia 13 (véase también el número de acceso de GenBank GI:7227128). La proteína correspondiente en el serogrupo A [12] tiene el número de acceso de GenBank 7379322. 741 es naturalmente una lipoproteína.

Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 741 puede tomar varias formas. Las formas preferentes de 741 son las variantes de truncamiento o supresión, tales como las desveladas en las referencias 21 a 23. En particular, la N-terminal de 741 puede suprimirse hasta incluir su secuencia de poliglicina (es decir, supresión de los residuos 1 a 72 para la cepa MC58 [SEQ ID NO:3], que algunas veces se distingue en el presente documento por el uso de un prefijo "ΔG. Esta supresión puede mejorar la expresión. La supresión también elimina el lugar de lipidación de 741.

Las secuencias preferentes de 741 tienen un 80% o más identidad (por ejemplo, 90%, 95%, 99% o más) con la SEQ ID NO: 3. Esto incluye variantes de 741 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogas, ortólogas, parálogas, mutantes, etc.). Las formas alélicas de 741 pueden encontrarse en las SEQ IDs 1 a 22 de la referencia 23, y en las SEQ IDs 1 a 23 y 123-141 de la referencia 27. Las SEQ IDs 1-299 de la referencia 28 dan más secuencias 741.

Otras secuencias 741 preferentes comprenden al menos n aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3, en los que n es 20 o más (por ejemplo, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferentes comprenden un epítipo de 741. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) de la C-terminal y/o la T-terminal de SEQ ID NO: 3.

La proteína 741 es un antígeno extremadamente efectivo para obtener respuestas de anticuerpo antimeningocócicas, y se expresa a través de todos los serogrupos meningocócicos. El análisis filogenético muestra que la proteína se divide en dos grupos, y que uno de estos se divide de nuevo para dar tres variantes en total [29], y mientras el suero cultivado contra una variante dada es bactericida dentro del mismo grupo de variante, no es activo contra las cepas que expresan una de las otras dos variantes, es decir, hay una multiprotección intravariante, pero una multiprotección intervariante. Para la máxima eficacia de la cepa de cruce, por lo tanto, es preferente que una composición incluya más de un variante de proteína 741. Una secuencia ejemplar de cada variante se da en las SEQ ID NOS: 10, 11 y 12 en el presente documento, empezando con un residuo de cisteína de N-terminal al que un lípido se unirá covalentemente en la forma de lipoproteína de 741.

Es por lo tanto preferente que la composición incluya al menos dos de: (1) una primera proteína, que comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos una identidad de secuencia $a\%$ con la SEQ ID NO: 10; (2) una segunda proteína, que comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos una $b\%$ identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11; y (3) una tercera proteína, que comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos $c\%$ de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12.

El valor de a es al menos 85, por ejemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. El valor de b es al menos 85, por ejemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. El valor de c es al menos 85, por ejemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o más. Los valores de a , b y c no están intrínsecamente relacionados entre sí.

Es preferente que cualquier secuencia 741 de aminoácido dada no corresponda a más de una de las categorías (1), (2) y (3). Cualquier secuencia 741 dada de este modo corresponderá a solamente una de las categorías (1), (2) y (3). Es de este modo preferente 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 $k\%$ 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 intrínsecamente relacionados entre sí.

Proteína 936

La proteína "936" del serogrupo B se desvela en la referencia 17 (SEQ IDs 2883 & 2884) y como "NMB2091" en la referencia 13 (véase también el número de acceso de GenBank GI:7227353). El gen correspondiente en el grupo A [12] tiene un número de acceso de GenBank 7379093.

Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 936 puede tomar varias formas. Las formas preferentes de 936 son las variantes de truncamiento o supresión, tales como las desveladas en las referencias 21 a 23. En particular, el péptido líder de N-terminal de 936 puede suprimirse (es decir, supresión de los residuos 1 a 24 para la cepa MC58 [SEQ ID NO:4]) PARA DAR 936^(NL).

Las secuencias 936 preferentes tienen un 80% o más identidad (por ejemplo, 90%, 95%, 99% o más) con la SEQ ID NO: 4. Esto incluye variantes de 741 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogas, ortólogas, parálogas, mutantes, etc.). Otras secuencias preferentes de 936 comprenden al menos n aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 4, donde n es 20 o más (por ejemplo, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferentes comprenden un epítipo de 936. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) de la C-terminal y/o la T-terminal de SEQ ID NO: 4.

Proteína 953

La proteína "953" del serogrupo B se desvela en la referencia 17 (SEQ IDs 2917 & 2918) y como "NMB1030" en la referencia 13 (véase también el número de acceso de GenBank GI:7226269). El gen correspondiente en el grupo A [12] tiene un número de acceso de GenBank 7380108.

Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 953 puede tomar varias formas. Las formas preferentes de 953 son las variantes de truncamiento o supresión, tales como las desveladas en las referencias 21 a 23. En particular, el péptido líder de N-terminal de 953 puede suprimirse (es decir, supresión de los residuos 1 a 19 para la cepa MC58 [SEQ ID NO:5]) PARA DAR 953^(NL).

Las secuencias 953 preferentes tienen un 80% o más identidad (por ejemplo, 90%, 95%, 99% o más) con la SEQ ID NO: 5. Esto incluye variantes de 953 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogas, ortólogas, parálogas, mutantes, etc.). Las formas alélicas de 953 pueden verse en la Figura 19 de la referencia 19.

Otras secuencias 953 preferentes de comprenden al menos n aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 5, donde n es 20 o más (por ejemplo, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferentes comprenden un epítipo de 953. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) de la C-terminal y/o la T-terminal de SEQ ID NO: 4.

Proteína 287

La proteína "287" del serogrupo B se desvela en la referencia 17 (SEQ IDs 3103 & 3104), como "NMB2132" en la referencia 13, y como "GNA2132 en la referencia 20 (véase también el número de acceso de GenBank GI:7227388). El gen correspondiente en el grupo A [12] tiene un número de acceso de GenBank 7379057.

Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la proteína 287 puede tomar varias formas. Las formas preferentes de 287 son las variantes de truncamiento o supresión, tales como las desveladas en las referencias 21 a 23. En particular, la N-terminal de 287 puede suprimirse hasta incluir su secuencia de poliglicina (es decir, supresión de los residuos 1 a 24 para la cepa MC58 [SEQ ID NO:6], que algunas veces se distingue en el presente documento por el uso de un prefijo "ΔG. Esta supresión puede mejora la expresión.

Las secuencias 287 preferentes tienen un 80% o más identidad (por ejemplo, 90%, 95%, 99% o más) con la SEQ ID NO: 6. Esto incluye variantes de 287 (por ejemplo, variantes alélicas, homólogas, ortólogas, parálogas, mutantes, etc.). Las formas alélicas de 287 pueden verse en las Figuras 5 a 15 de la referencia 19, y en el ejemplo 13 y la figura 21 de la referencia 17 (SEQ ID Nos 3179 a 3184).

Otras secuencias 287 preferentes comprenden al menos n aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 6, donde n es 20 o más (por ejemplo, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Los fragmentos preferentes comprenden un epítipo de 287. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) de la C-terminal y/o la T-terminal de SEQ ID NO: 6.

Proteínas de fusión

Los cinco antígenos pueden estar presentes en las composiciones como cinco polipéptidos separados, pero es preferente que al menos dos de los antígenos se expresen como una cadena sencilla de polipéptidos (una proteína "híbrida" [refs. 21 a 24]), por ejemplo, de tal manera que los cinco antígenos formen menos de cinco polipéptidos. Las proteínas híbridas ofrecen dos ventajas principales: en primer lugar, una proteína que puede ser inestable o expresarse pobremente sobre sí misma puede ayudarse añadiendo una pareja híbrida adecuada que supere el problema; en segundo lugar, la fabricación comercial se simplifica como solamente una expresión y necesita emplearse purificación con el fin de producir dos proteína útiles por separado.

Una proteína híbrida incluida en una composición de la invención puede comprender dos o más (es decir, 2, 3, 4 ó 5) de los cinco antígenos básicos. Los híbridos consistentes en dos de los cinco antígenos básicos son preferentes.

Dentro de la combinación de los cinco antígenos básicos, un antígeno puede estar presente en más de una proteína híbrida y/o como un una proteína no híbrida. Sin embargo, es preferente que un antígeno esté presente bien como un híbrido o como un no híbrido, pero no como ambos, aunque puede ser útil incluir la proteína 741 tanto como un

antígeno híbrido como no híbrido (preferentemente lipoproteína), particularmente donde se usa más de una variante de 741.

5 Híbridos de dos antígenos para su uso en la invención comprende: NadA & 741; NadA & 936; NadA & 953; NadA & 287; 741 & 936; 741 & 953; 741 & 287; 936 & 953; 936 & 287; 953 & 287. Los híbridos de dos antígenos preferentes comprende: 741 & 936; 953 & 287. Ver más detalles en la referencia 24.

10 Las proteínas híbridas pueden representarse mediante la fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}[\text{-X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, donde: X es una secuencia de aminoácido de uno de los cinco antígenos básicos; L es una secuencia de aminoácido enlazante opcional; A es una secuencia de aminoácido de N-terminal opcional; B es una secuencia de aminoácido de C-terminal opcional; y n es 2, 3, 4 ó 5.

15 Si una fracción X tiene una secuencia de péptido líder en su forma de tipo salvaje, ésta puede incluirse u omitirse en la proteína híbrida. En algunas realizaciones, los péptidos líderes se suprimirán excepto para los de la fracción X situados en la N-terminal de la proteína híbrida, es decir, el péptido líder de X_1 se retendrá, pero los péptidos líderes de $X_2 \dots X_n$ se omitirán. Esto es equivalente a suprimir todos los péptidos líderes y usar el péptido líder de X_1 como fracción -A-.

20 Para cada caso n de $[\text{-X-L-}]_n$, la secuencia de aminoácido enlazante -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando $n=2$ el híbrido puede ser $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, et. La secuencia o secuencias de aminoácido enlazantes -L- serán típicamente cortas (por ejemplo, 20 o menos aminoácidos, es decir, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos comprenden secuencias de péptido corto que facilitan la clonación, los enlazantes de poliglicina (es decir, que comprenden Gly_n , donde $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más), y etiquetas de histidina (es decir, His_n , donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácido enlazantes serán aparentes para aquellos expertos en la técnica. Un enlazante útil es GSGGGG (SEQ ID NO: 9), con el dipéptido Gly-Ser formándose a partir de un punto de restricción *Bam*HI, ayudando de este modo a la clonación y manipulación, y el tetrapéptido $(\text{Gly})_4$ que es un enlazante típico de poliglicina. Si X_{n+1} es una proteína ΔG y L_n es un enlazante de glicina, esto puede equivaler a que X_{n+1} no sea un proteína ΔG y que L_n esté ausente.

30 -A- es una secuencia de aminoácido de N-terminal opcional. Ésta será típicamente 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, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias líderes para dirigir la proteína circulante, o secuencias de péptidos cortos que facilitan la clonación o purificación (por ejemplo, etiquetas de histidina, es decir, His_n , donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más). Otras secuencias de aminoácido de N-terminal adecuadas serán aparentes para aquellos expertos en la técnica. Si X_1 carece de su propia metionina de N-terminal, -A- es preferentemente un oligopéptido (por ejemplo, con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos) que proporciona una metionina de N-terminal.

40 -B- es una secuencia de aminoácido de C-terminal opcional. Ésta será típicamente 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, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias para dirigir la proteína circulante, secuencias de péptidos cortos que facilitan la clonación o purificación (por ejemplo, comprenden etiquetas de histidina, es decir, His_n , donde $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más) o secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína. Otras secuencias de aminoácido de C-terminal adecuadas serán aparentes para aquellos expertos en la técnica.

50 Más preferentemente, n es 2. Dos proteínas preferentes de este tipo son: X_1 es una 936 y X_2 es una 741; X_1 es una 287 y X_2 es una 953.

Dos proteínas híbridas particularmente preferentes de la invención son las siguientes:

n	A	X_1	L_1	X_2	L_2	B	[SEQ ID NO:]
2	MA	ΔG287	SEQ ID NO:9	953 ^(NL)	---	---	7
2	M	936 ^(NL)	SEQ ID NO:9	ΔG741	---	---	8

55 Estas dos proteínas pueden usarse en combinación con NadA (particularmente con la SEQ ID NO: 2) [24]

Las mezclas que excluyen OMVs y/o que excluyen lipooligosacáridos son preferentes.

Vesículas de membrana externa

60 Además de usar antígenos de polipéptido, la invención puede emplear preparaciones de microvesículas N.meningitidis [30], "OMVs nativas" [31], ampollas o vesículas de membrana externa (por ejemplo, refs. 32 a 37 etc. del serogrupo B). Todas estas diferentes preparaciones de bacterias que han sido genéticamente manipuladas [38-41], por ejemplo, para aumentar la inmunogenicidad (por ejemplo, hiperexpresar inmunógenos), para reducir

toxicidad, para inhibir la síntesis de polisacárido capsular, para reducir o eliminar la expresión PorA, para reducir o eliminar la expresión IgtB [42], etc. Pueden prepararse a partir de cepas de hiperampollas [43-46]. Las vesículas de una *Neisseria* no patógena pueden incluirse [47]. Las OMVs pueden prepararse sin el uso de detergentes [48,49]. Pueden expresar proteínas no-*Neisseriales* sobre su superficie [50]. Pueden estar deplecionados de LPS. Pueden retener lipooligosacárido como un antígeno importante [42, 51]. Pueden mezclarse con antígenos recombinantes [32, 52]. Pueden tratarse para reducir la variabilidad de fase del inmunitipo de lipooligosacárido [53]. Pueden usarse mezclas de OMVs [30] incluyendo mezclas de diferentes serotipos y/o serosubtipos [30, 54].

Pueden usarse vesículas de bacterias con diferentes subtipos de proteína de membrana exterior de clase I, por ejemplo, seis subtipos [55, 56] que usan dos poblaciones diferentes de vesículas creadas genéticamente mostrando cada una tres subtipos, o nueve subtipos diferentes que usan tres poblaciones diferentes de vesículas creadas genéticamente mostrando cada una tres subtipos, etc. Los subtipos útiles incluye: P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1; P1.18-1,3,6.

15 **Resultado de la inmunización**

El resultado de la inmunización será la generación de anticuerpos en el sujeto que (a) reconocen el polipéptido inmunogénico y (b) son protectores contra la infección de múltiples serotipos meningocócicos. Un resultado típico de la inmunización será la generación de una respuesta de anticuerpo que es bactericida contra al menos meningococo del serogrupo Y, y más típicamente contra cada uno de los serogrupos A, B, C, W134 e Y.

Un resultado preferente es la inmunización efectiva contra: (a) serogrupos Y y A; (b) serogrupos Y y B; (c) serogrupo Y y C; (d) serogrupos Y y W135; etc. La inmunización contra al menos los serogrupos A, B, C e Y es preferente. También puede proporcionarse protección contra otros serogrupos (no patógenos), por ejemplo, H, I, K, L, Z, 29E, etc. También puede proporcionarse protección contra otras especies *Neisseria*, por ejemplo, lactamica, gonorrea, cinérea, etc.

Después de la inmunización, un suero preferentemente tiene 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 alto, preferentemente al menos 2^{14}), es decir, el suero es capaz de matar al menos el 50% de las bacterias de la prueba de una cepa particular cuando se diluye 1/1024, como se describe en la referencia 20.

Serogrupos y cepas

Las composiciones y usos de la invención son preferentemente para inmunizar un sujeto contra la infección por el serogrupo Y y también contra al menos uno de los serogrupos A, B, C y W135.

Las proteínas usadas con la invención comprenden una secuencia de aminoácido encontrada en el serogrupo B de *N. meningitidis*. Dentro del serogrupo B, las cepas preferentes son 2996, MC58, 95N477 y 394/98. La cepa 394/98 es algunas veces referida en el presente documento como "NZ", ya que es una cepa de Nueva Zelanda.

La proteína 287 es preferentemente de la cepa 2996, o más preferentemente, de la cepa 394/98.

La proteína 741 es preferentemente de las cepas MC58, 2996, 394/98 o 95N477 del serogrupo B o de la cepa 90/18311 del serogrupo C. La cepa MC58 es más preferente.

Las proteínas 936, 953 y NadA son preferentemente de la cepa 2996.

Las cepas pueden indicarse como un subíndice, por ejemplo, 741_{MC58} es la proteína 741 de la cepa MC58. A menos que se establezca lo contrario, las proteínas mencionadas en el presente documento (por ejemplo, sin subíndice), son de la cepa 2996 de *N. meningitidis*, que puede tomarse como una cepa "referencia". Sin embargo, se apreciará que la invención no está en general limitada por la cepa. Como se ha mencionado anteriormente, las referencias generales para una proteína (por ejemplo, "287", "919", etc.) pueden tomarse para incluir esa proteína de cualquier cepa. Esto tendrá típicamente identidad de secuencia con 2996 del 90% o más (por ejemplo, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más).

Donde una composición incluye un antígeno de proteína particular (por ejemplo, 741 o 287), la composición puede incluir ese antígeno en más de una forma variante, por ejemplo, la misma proteína, pero de más de una cepa. Estas proteínas pueden incluirse como proteínas tándem o separadas.

Donde se usan proteínas híbridas, los antígenos individuales dentro del híbrido (es decir, fracciones individuales -X-) pueden ser de una o más cepas. Donde $n=2$, por ejemplo, X_2 puede ser de la misma cepa que X_1 o de una cepa diferente. Donde $n=3$, las cepas pueden ser (i) $X_1=X_2=X_3$ (ii) $X_1=X_2 \neq X_3$ (iii) $X_1 \neq X_2=X_3$ (iv) $X_1 \neq X_2 \neq X_3$ o (v) $X_1=X_3 \neq X_2$, etc.

Linajes hipervirulentos y respuestas de anticuerpo bactericidas

En general, las composiciones de la invención son capaces de inducir respuesta de anticuerpo bactericida del suero después de administrarse al sujeto. Estas respuestas se miden convenientemente en ratones y son un indicador estándar de eficacia de la vacuna [por ejemplo, véase nota final 14 de la referencia 20]. La actividad bactericida del suero (ABS) mide la eliminación bacteriana mediada por complemento, y puede ensayarse usando complemento humano o de bebé conejo. Las normas de la OMS requieren una vacuna para inducir al menos un aumento 4 veces en ABS en más del 90% de los receptores.

Más que ofrecer una limitada protección, las composiciones de la invención pueden inducir respuestas de anticuerpo bactericidas contra más de un serogrupo de meningococo. Dentro de los serogrupos, las composiciones pueden inducir respuestas de anticuerpo contra más de un linaje hipervirulento. En particular, pueden inducir respuestas bactericidas contra dos o más de los siguientes linajes hipervirulentos: (i) grupo A4; (ii) complejo ET5; y (iii) linaje 3. Pueden además inducir respuestas de anticuerpo bactericidas contra uno o más linajes virulentos subgrupo I, subgrupo III, subgrupo IV-1 o complejo ET-37, y contra otros linajes, por ejemplo, linajes hiperinvasivos. Sin embargo, las composiciones no necesitan inducir anticuerpos bactericidas contra cada cepa de un linaje hipervirulento particular.

Las composiciones preferentes pueden inducir respuestas bactericidas contra: (a) cepa 860800, ES13822, ES15085 y/o ES14487 de meningococo del serogrupo Y; (b) cepa F6124 de meningococo del serogrupo A; (c) cepa LPN17592 de meningococo del serogrupo W135; (d) cepa C11 de meningococo del serogrupo C; (e) dentro de meningococo del serogrupo B: (i) del grupo A4, cepa 961-5945 (B:2b:P1.21,16) y/o cepa G2136 (B:-); (ii) del complejo ET-5, cepa MC58 (B:15:P1.7,16b) y/o cepa 44/76 (B:15:P1.7,16); (iii) del linaje 3, cepa 394/98 (B:4:P1.4) y/o cepa BZ198 (B:NT:-).

La cepa 860800 del serogrupo Y se ve en la fila 29 de la referencia 1, y en la referencia 57. La cepa F6124 del serogrupo A se ve en las referencias 20, 57 y 58. La cepa C11 del serogrupo C es una de las cepas de referencia desveladas en la ref. 59. Las cepas 961-5945 y G2136 del serogrupo B son ambas cepas de referencia de *Neisseria* MLST (ids 638 & 1002 en la ref. 60]. La cepa 44/76 se ha usado y caracterizado mucho (por ejemplo, ref. 61) y es una de las cepas de referencia de *Neisseria* MLST (id 237 en ref. 60; fila 32 de la Tabla 2 en la ref. 1]. La cepa 394/98 se aisló originalmente en Nueva Zelanda en 1998, y ha habido varios estudios publicados que usan esta cepa (por ejemplo, refs. 62 y 63). La cepa BZ198 es otra cepa de referencia MLST [id 409 en la ref. 60; fila 41 de la Tabla 2 en la ref. 1].

Composiciones inmunogénicas y medicamentos

Las composiciones de la invención son inmunogénicas, y más preferentemente son composiciones de vacuna. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección, pero típicamente serán profilácticas).

El pH de la composición está preferentemente entre 6 y 8, preferentemente aproximadamente 7. El pH estable puede mantenerse mediante el uso de un tampón. Donde una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, es preferente usar un tampón de histidina [64]. Las composiciones pueden ser estériles y/o libres de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los humanos.

Las composiciones pueden presentarse en viales, o pueden presentarse en jeringas preparadas con la carga. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una única dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una única dosis o múltiples dosis. Las composiciones inyectables serán normalmente soluciones líquidas o suspensiones. Como alternativa, pueden presentarse en forma sólida (por ejemplo, liofilizadas) para una solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

Las composiciones de la invención pueden empaquetarse en forma de unidad de dosis o en forma de múltiples dosis. Para formas de múltiples dosis, los viales son preferentes a las jeringas pre-cargadas. Los volúmenes efectivos de dosis pueden establecerse rutinariamente, pero una dosis típica para un humano de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

Donde una composición de la invención se preparará extemporáneamente antes de su uso (por ejemplo, donde un componente se presenta en forma liofilizada), y se presenta como un kit, el kit puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa preparada con carga y un vial, usándose los contenidos de la jeringa para reactivar los contenidos del vial antes de la inyección.

La inmunización de la invención es en un mamífero, preferentemente un humano. Donde la vacuna es para uso profiláctico, el humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un bebé o niño pequeño); donde la vacuna es para uso terapéutico, el humano es preferentemente un adulto. Una vacuna prevista para niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, posología, inmunogenicidad, etc.

Estos usos y métodos son para la prevención de una enfermedad causada por la infección por el serogrupo Y de *Neisseria meningitidis* (por ejemplo, meningitis, septicemia, bacteremia, etc.). La prevención y/o tratamiento de meningitis bacteriana o meningocócica es preferente.

5 Una manera de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica el control de la infección *Neisserial* después de la administración de la composición de la invención. Una manera de comprobar la eficacia del tratamiento
10 profiláctico implica el control de respuestas inmunes contra los antígenos administrados. La inmunogenicidad de las composiciones de la invención puede determinarse administrándolas a sujetos de la prueba (por ejemplo, niños de edad 12-16 meses, o modelos de animales [65]) y después determinando parámetros estándares que incluyen anticuerpos bactericidas del suero (ABS) y títulos ELISA (GMT) de total e IgG de alta avidéz. Estas respuestas
15 inmunes se determinarán generalmente alrededor de 4 semanas después de la administración de la composición, y se compararán con los valores determinados antes de la administración de la composición. Un aumento de ABS de al menos 4 veces u 8 veces es preferente. Donde se administra más de una dosis de la composición, puede hacerse más de una determinación post-administración.

20 Las composiciones preferentes de la invención pueden conferir un título de anticuerpo en un paciente que es superior al criterio para la seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpo asociado sobre el cual se considera que un huésped se seroconvertirá contra el antígeno son bien conocidos, y tales títulos se publican por organizaciones tales como OMS. Preferentemente, más del 80% de una muestra estadísticamente significativa de sujetos se seroconvierte, más preferentemente más del 90%, aún más preferentemente más del 93% y más preferentemente 96-100%.

25 Las composiciones se administrarán generalmente directamente a un paciente. La entrega directa puede conseguirse mediante inyección parenteral (por ejemplo, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, o el espacio intersticial de un tejido, o por administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración mucosa. La administración intramuscular en el muslo o en la parte superior del brazo es preferente. La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

30 La invención puede usarse para obtener inmunidad sistémica y/o mucosal.

35 El tratamiento de dosis puede ser un programa con una única dosis o un programa con múltiples dosis. Las múltiples dosis pueden usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de recuerdo. Un programa de dosis primaria puede estar seguido por un programa de dosis de recuerdo. La coordinación de tiempo adecuada entre las dosis estimulantes (por ejemplo, entre 4-16 semanas), y entre la estimulación y el recuerdo, pueden determinarse rutinariamente.

40 Las infecciones *Neisseriales* afectan a varias áreas del cuerpo y de este modo las composiciones de la invención pueden prepararse de varias formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una composición liofilizada). La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, como una pomada, crema o polvos. La composición puede prepararse para administración oral, por ejemplo, como un comprimido o cápsula, o como un jarabe (opcionalmente con sabor). La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un aerosol. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, como aerosol, gotas, gel o polvos [por ejemplo, refs. 66 & 67]. Se ha presentado el éxito con administración nasal de sacáridos neumocócicos [68, 69], polipéptidos neumocócicos [70], sacáridos Hib [71], sacáridos MenC [72], y mezclas de conjugados de sacárido Hib y MenC [73].

55 Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de antígeno(s), así como cualquier otro componente, si es necesario. Por "cantidad inmunológicamente efectiva", se entiende que la administración de esta cantidad a un individuo, bien en una única dosis o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, 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 deseada, la formulación de la vacuna, la valoración del doctor que lo trate de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad corresponderá a un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos rutinarios, y una cantidad típica de cada antígeno de sacárido meningococo por dosis se encuentra entre 1 µg y 20 µg, por ejemplo, aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg o aproximadamente 10 µg (expresado como sacárido).

Más componentes no antígenos de la composición

La composición de la invención comprenderá típicamente, además de los componentes anteriormente mencionados, uno o más “portadores farmacéuticamente aceptables”, que incluyen cualquier portador que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los portadores adecuados son típicamente macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, sacarosa [74], trehalosa [75], lactosa, y agregados lípidos [tales como gotitas de aceite o liposomas]. Tales portadores son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias amortiguadoras de pH, y similares. La solución salina fisiológica estéril libre de pirógeno, amortiguada con fosfato es un portador típico. Una discusión minuciosa de excipientes farmacéuticamente aceptable está disponible en la referencia 76.

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

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

Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. Una concentración de 10±2 mg/ml NaCl es típica.

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

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

Las vacunas de la invención pueden administrarse en conjunto con otros agentes inmunoreguladores. En particular, las composiciones normalmente incluirán un adyuvante. Los adyuvantes que pueden usarse en las composiciones de la invención incluyen, aunque no se limitan a:

A. Composiciones que contienen mineral

Las composiciones que contienen mineral 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, oxihidróxidos), fosfato (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véase capítulos 8 & 9 de la ref. 77], o mezclas de diferentes compuestos minerales, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y siendo preferente la adsorción. Las composiciones que contienen mineral pueden también formularse como una partícula de sal metálica [78].

Los fosfatos de aluminio son particularmente preferentes, particularmente en composiciones que incluyen un antígeno sacárido de *H. influenzae*, y un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción mola PO_4/Al de entre 0,84 y 0,92, incluido en 0,6 mg Al^{3+}/ml . Puede usarse adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio, por ejemplo, entre 50 y 100 $\mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$ por conjugado por dosis. Donde hay más de un conjugado en una composición, no es necesario adsorber todos los conjugados.

B. Emulsiones de Aceite

Las emulsiones de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MSF59 [Capítulo 10 de ref. 77; véase también ref. 79] (5% Escualeno, 0,5% Tween 80 y 0,5% Span 85, formulado en partículas submicrón usando un microfluidizador). También pueden usarse Adyuvante Completo de Freund (ACF) y Adyuvante Incompleto de Freund (AIF).

C. Formulaciones de Saponina [capítulo 22 de ref. 77]

Las formulaciones de saponina también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glicósidos esteroideos y glicósidos triterpénicos que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia variedad de especies de plantas. Las saponinas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado mucho como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente a partir de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (paniculata), y *Saponaria officianalis* (planta jabonera). Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lípidas, tales como ISCOMs. QS21 se comercializa como Stimulon™.

Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas que usan estas técnicas, que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B Y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un método de producción de QS21 se desvela en la ref. 80. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroide. Tal como colesterol [81].

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar únicas partículas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCs) [capítulo 23 de ref. 77]. Los ISCs típicamente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede usarse en ISCs. Preferentemente, el ISC incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCs se describen más en las refs. 81-83. Opcionalmente, los ISCs pueden estar libres de detergente adicional [84].

Un estudio del desarrollo de saponina en base a adyuvantes puede encontrarse en las ref. 85 y 86.

D. Virosomas y partículas tipo virus

Los virosomas y partícula tipo virus (PTVs) también pueden encontrarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Estas son generalmente no patógenas, no duplicantes y generalmente no contienen ninguno de los genomas virales nativos. Las proteínas virales pueden producirse recombinantemente o aislarse de los virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o PTVs incluyen proteínas derivadas de virus de influenza (tal como HA o NA), virus de Hepatitis B (tal como proteínas centrales o de la cápside), virus de Hepatitis E, virus del sarampión, virus de Sindbis, Rotavirus, virus de fiebre aftosa, Retrovirus, virus de Norwalk, virus del Papiloma humano, VIH, ARN-fagos, Q β -fago (tal como proteínas de la cubierta), GA-fago, fr-fago, AP205 fago y Ty (tal como retrotransposón Ty proteína p1). Las PTVs se analizan más en las refs. 87-92. Los virosomas se analizan más en, por ejemplo, ref. 93.

E. Derivados bacterianos y microbiales

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos y microbiales tales como derivados no tóxicos de lipopolisacáridos enterobacterianos (LPS), derivados de Lípido A, oligonucleótidos inmunoestimulantes y toxinas ADP-ribosiladas y derivados detoxificados de los mismos.

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen lípido monofosforil (MPL) y MPL 3-O-decilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 de-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma preferente de "partícula pequeña" de monofosforil lípido A 3 de-O-acilado se desvela en la ref. 94. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para filtrarse estériles a través de una membrana de 0,22 μ m [94]. Otros derivados LPS no tóxicos incluyen imitadores de monofosforil lípido A, tales como derivados de fosfato de glucosaminida de aminoalquilo.

Los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tal como OM-174. OM-174 se describe por ejemplo en la refs. 97 y 98.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen la unidad CpG (una secuencia de dinucleótido que contiene una citosina no metilada unida por un enlace de fosfato a una guanina). Los ARNs de doble hélice y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) también han demostrado ser inmunoestimulantes.

Los CpGs incluyen modificaciones/análogos de nucleótido tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble hélice o de única hélice. Las referencias 99, 100 y 101 desvelan posibles sustituciones análogas, por ejemplo, sustitución de guanina por 2'-deoxi-7-deazaguanina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza más en las refs. 102-107.

La secuencia CpG pueden dirigirse a TLR9, tal como la unidad GTGTT o TTCGTT [108]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, tal como una CpG-A ODN, o puede ser más específica para inducir una respuesta de célula B, tal como una CpG-B ODN. CpG-A y CpG-B ODNs se analizan en las refs. 109-111. Preferentemente, la CpG es una CpG-A ODN.

Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye para que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, pueden unirse dos secuencias de oligonucleótido CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, refs. 108 y 112-114.

Las toxinas bacterianas ADP-ribosiladas y los derivados detoxificados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de E. coli (enterotoxina termolábil "LT" de E. coli), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas detoxificadas ADP-ribosiladas como adyuvantes mucosales se describe en la ref. 115 y sus adyuvantes parenterales en la ref. 116. La toxina o toxoide tiene preferentemente la forma de una holotoxina, comprendiendo subunidades A y B. Preferentemente, la subunidad A contiene una

mutación detoxificante; preferentemente la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es un mutante LT detoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ADP-ribosiladas y derivados detoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes pueden encontrarse en las refs. 117-124. La referencia numérica para sustituciones de aminoácido se basa preferentemente en las alineaciones de las subunidades A y B de toxinas ADP-ribosiladas establecidas en la ref. 125, incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su integridad.

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso en la invención incluyen citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [126], etc.) [127], interferones (por ejemplo, interferón-γ), factor estimulante de colonia de macrófago, y factor de necrosis tumoral.

G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

Los bioadhesivos y mucoadhesivos también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [128] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de ácido poli(acrílico), alcohol de polivinilo, pirrolidona de polivinilo, polisacáridos y carboximetilcelulosa. Chitosán y derivados de los mismos también pueden usarse como adyuvantes en la invención [129]

H. Micropartículas

Las micropartículas también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las micropartículas (es decir, partícula de diámetro de ~100 nm a ~150 μm en diámetro, más preferentemente de ~200 nm a ~30 μm en diámetro, y más preferentemente de ~500 nm a ~10 μm en diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un ácido poli(α-hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(láctido-co-glicólido) son preferentes, opcionalmente tratados para tener una superficie con carga negativa (por ejemplo, con SDS), o una superficie con carga positiva (por ejemplo, con un detergente catiónico), tal como CTAB.

I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de ref. 77)

Los ejemplos de las formulaciones de liposomas para su uso como adyuvantes se describen en las refs. 130-132.

J. Formulaciones de éter polioxietileno y éster polioxietileno

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [133]. Tales formulaciones incluyen además surfactantes de éster de sorbitan de polioxietileno en combinación con un octoxinol [134] así como éteres de alquil de polioxietileno o surfactantes de éster en combinación con al menos un surfactante adicional no iónico tal como octoxinol [135]. Los éteres de polioxietileno preferentes se seleccionan del siguiente grupo: éter polioxietileno-9-lauril (laureth 9), éter polioxietileno-9-esteoril, éter polioxietileno-8-esteoril, éter polioxietileno-4-lauril, éter polioxietileno-35-lauril y éter polioxietileno-23-lauril.

K. Polifosfaceno (PCPP).

Las formulaciones PCPP se describen, por ejemplo, en las refs. 136 y 137.

L. Péptidos de muramíl

Ejemplos de péptidos de muramíl adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramíl-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramíl-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramíl-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxil-etilamina MTP-PE).

M. Compuestos de Imidazoquinolona

Los compuestos de imidazoquinolona adecuados para usar adyuvantes en la invención incluyen Imiquamod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), más descrito en las refs. 138 y 139.

La invención puede comprender además combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvantes pueden usarse en la invención (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [14]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [141]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [142]; (5) combinación de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de agua en aceite [143]; (6) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% Tween 80™, 5% polímero de bloque plurónico L121, y thr-MDP, bien microfluidizado en una emulsión submicrónica o mezclado en el vórtex para generar una emulsión con tamaño más grande de partícula. El sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2% escualeno, 0,2% Tween 80, y uno o más

componentes de la pared celular bacteriana del grupo consistente en monofosforilípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM), y esqueleto de la pared celular (EPC), preferentemente MPL + TDM (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tales como sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

5 Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 77.

10 El uso de adyuvante de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio es particularmente preferente, y los antígenos generalmente se adsorben a estas sales. El hidróxido de aluminio se evita preferentemente como un adyuvante si su composición incluye un antígeno Hlb. Donde se usa un fosfato de aluminio y no se desea adsorber un antígeno al adyuvante, esto se favorece incluyendo iones libres de fosfato en la solución (por ejemplo, mediante el uso de un tampón de fosfato). La prevención de la adsorción también puede conseguirse seleccionando el pH correcto durante la mezcla antígeno/adyuvante, un adyuvante con un punto apropiado de carga cero, y un orden apropiado de mezcla de diferentes antígenos en una composición [144].

15 El fosfato de calcio es otro adyuvante preferente

Antígenos adicionales

20 Las composiciones de la invención contienen antígenos de proteína meningocócicos como se define en las reivindicaciones. También pueden incluir más antígenos, aunque pueden no contener antígenos de proteína meningocócicos diferentes a los cinco antígenos básicos. Más antígenos para su inclusión pueden ser, por ejemplo:

- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B.
- un antígeno de sacárido de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 y/o Y, tal como el sacárido desvelado en la ref. 5 del serogrupo C o los sacáridos de la ref. 8 (véase más abajo).
- 25 - un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, 180, 181 182].
- un antígeno de virus de hepatitis A, tal como un virus inactivado [por ejemplo, 145, 146].
- un antígeno de virus de hepatitis B, tal como antígenos de superficie y/o de núcleo [por ejemplo, 146, 147].
- un antígeno de difteria, tal como toxoide de difteria [por ejemplo, capítulo 3 de ref. 148] por ejemplo, el mutante CRM₁₉₇ [por ejemplo, 149].
- 30 - un antígeno de tétano, tal como un toxoide de tétano [por ejemplo, capítulo 4 de la ref. 148].
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina de pertussi (PT) y hemaglutinina filamentosa (HAF) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, refs. 150 y 151]. Puede usarse el antígeno de pertussis celular.
- una preparación de la vesícula de membrana externa (OMV) de *N. meningitidis* serogrupo B, tales como las desveladas en las refs. 34, 35, 37, 152, etc.
- 35 - polio antígeno(s) [por ejemplo, 153, 154] tales como OPV o, preferentemente, IPV.

40 La composición puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales. Los antígenos estarán presentes típicamente en una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para obtener una respuesta inmune contra ese antígeno. Es preferente que la eficacia protectora de los antígenos sacáridos individuales no se elimine combinándolos, aunque la inmunogenicidad real (por ejemplo, títulos ELISA) puede reducirse.

45 Donde se incluye un antígeno de difteria en la composición es preferente incluir también antígeno de tétano y antígenos de pertussis. Similarmente, donde se incluye un antígeno de tétano es preferente incluir también antígeno de difteria y antígenos de pertussi. Similarmente, donde se incluyen un antígeno de pertussis es preferente incluir también antígenos de difteria y tétano. Tales combinaciones DTP pueden usarse para reconstituir conjugados liofilizados.

50 Donde se usa un antígeno de sacárido o carbohidrato, está preferentemente conjugado a una proteína portadora con el fin de mejorar la inmunogenicidad (véase más abajo).

55 Los antígenos de proteína tóxica pueden detoxificarse donde sea necesario (por ejemplo, detoxificación de toxina pertussis mediante medios químicos y/o genéticos [151]).

Las composiciones de la invención pueden comprender proteínas que imitan los antígenos de sacáridos, por ejemplo, mimótopos [164] o anticuerpos anti-idiotipo. Estos pueden sustituir los componentes sacáridos individuales, o pueden complementarlos. Como ejemplo, la vacuna puede comprender un imitador peptídico del polisacárido capsular MenC [165] o el MenA [166] en lugar del propio sacárido.

60 Las composiciones particularmente preferentes de la invención incluyen cualquiera de o ambos: (a) un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B; y/o (b) un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*. También pueden incluir antígenos de sacáridos de meningococo serogrupo Y, W135, C y A, excepto que el sacárido de un serogrupo dado puede incluirse solamente donde el polipéptido o polipéptidos no son para proporcionar protección contra ese serogrupo.

65

Haemophilus influenzae tipo B

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

Ventajosamente, el sacárido Hib está covalentemente conjugado con una proteína portadora, con el fin de mejorar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados de polisacárido en general, y del polisacárido capsular Hib, está bien documentada [por ejemplo, referencias 167 a 175 etc.]. La invención puede usar cualquier conjugado Hib adecuado. Las proteínas portadoras adecuadas se describen más abajo, y los portadores preferentes para sacáridos Hib son CRM197 ("HbOC"), toxoide de tétano ("PRP-T") y el complejo de membrana externa de *N. meningitidis* ("PRP-OMP").

La fracción de sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo, fosfato poliribosilribitol de longitud completa (PRP)), pero es preferente hidrolizar polisacáridos para formar oligosacáridos (por ejemplo, MW de ~1 a ~5 kDa).

Un conjugado preferente comprende un oligosacárido Hib covalentemente unido a CRM₁₉₇ por medio de un enlazante [176, 177]. El toxoide de tétano es también un portador preferente.

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

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

Donde una composición incluye un antígeno de sacárido Hib, es preferente que no incluya un adyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio entonces el antígeno Hib puede adsorberse al adyuvante [178] o puede no adsorberse [179].

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

Streptococcus pneumoniae

Donde la composición incluye un antígeno de *Streptococcus pneumoniae*, será típicamente un antígeno de sacárido capsular que está preferentemente conjugado a una proteína portadora [por ejemplo, refs. 180 a 182]. Es preferente incluir sacáridos de más de un serotipo de *S. pneumoniae*. Por ejemplo, mezclas de polisacáridos de 23 serotipos diferentes se usan mucho, como lo son vacunas conjugadas con polisacáridos de entre 5 a 11 serotipos diferentes [183]. Por ejemplo, PrevNar™ [184] contiene antígenos de siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) con cada sacárido conjugado individualmente con CRM₁₉₇ por medio de aminación reductiva, con 2 μg de cada sacárido por dosis de 0,5 ml (4 μg de serotipo 6B), y con el conjugado adsorbido sobre un adyuvante de fosfato de aluminio. Las composiciones de la invención incluyen preferentemente al menos serotipos 6B, 14, 19F y 23 F. los conjugados puede adsorberse en un fosfato de aluminio.

Como alternativa a usar antígenos de sacáridos de neumococo, la composición puede incluir uno o más antígenos de polipéptido. Las secuencias de genoma para varias cepas de neumococo están disponibles [185, 186] y pueden someterse a vacunología inversa [187-190] para identificar los antígenos de polipéptido adecuados [191, 192]. Por ejemplo, la composición puede incluir uno o más de los siguientes antígenos: PhtA, PhtD, PhtB, PHtE, SpsA, LytB, LytC, LytC, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp130, como se define en la referencia 193. La composición puede incluir más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14) de esto antígenos.

En algunas realizaciones, la composición puede incluir antígenos de sacárido y de polipéptido de neumococo. Estos pueden usarse en una mezcla simple, o el antígeno de sacárido neumocócico puede conjugarse con una proteína neumocócica. Las proteínas portadoras adecuadas para tales realizaciones incluyen los antígenos enumerados en el párrafo anterior [193].

Los antígenos neumocócicos pueden liofilizarse, por ejemplo, junto con antígenos meningocócicos y/o Hib.

Meningococo serogrupos Y, W135, C y A

Como se ha mencionado anteriormente las vacunas de polisacárido contra los serogrupos A, C, W135 e Y se han conocido durante muchos años. Estas vacunas (MENGEVAX ACWY™ y MENOMUNE™) se basan en polisacáridos capsulares de organismos y, aunque son efectivas en adolescentes y adultos, dan una respuesta inmune pobre y corta duración de protección, y no pueden usarse en niños.

A diferencia de los antígenos de polisacárido no conjugados en estas vacunas, las vacunas de serogrupo C recientemente aprobadas (Menjugate™ [4], Meningitec™ y NeisVac-C™) incluyen sacáridos conjugados.

Menjugate™ y Meningitec™ tienen antígenos de oligosacárido conjugados con un portador CRM₁₉₇, mientras que NeisVac-C™ usa el polisacárido completo (de-O-acilado) conjugado con un portador de toxoide de tétano.

Las composiciones de la presente invención incluyen preferentemente antígenos de sacárido capsular de uno o más de los serogrupos Y, W135, C y A de meningococo, en las que los antígenos se conjugan con una proteína o proteínas portadoras y son opcionalmente oligosacáridos. Los polisacáridos capsulares meningocócicos y sus conjugados pueden prepararse como se ha descrito en las referencias 7 y 8.

Una cantidad típica de cada antígeno de polisacárido meningocócico por dosis está entre 1 µg y 20 µg, por ejemplo, aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 1 µg o aproximadamente 10 µg (expresado como sacárido).

Donde una mezcla comprende sacáridos capsulares de los serogrupos A y C, la proporción (p/p) de sacárido MenA:sacárido MenC puede ser mayor que 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor). Donde una mezcla comprende sacáridos capsulares del serogrupo Y y uno o los dos serogrupos C y W135, la proporción (p/p) de sacárido MenY:sacárido Men135 puede ser mayor que 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor) y/o que la proporción (p/p) de sacárido MenY:sacárido MenC puede ser menor que 1 (por ejemplo, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o menor). Las proporciones preferentes (p/p) para sacáridos de los serogrupos A:C:W135:Y son: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:1; 4:4:1:1 y 2:2:2:1. Las proporciones preferentes (p/p) para sacáridos de serogrupos C:W135:Y son 1:1:1; 1:1:2; 2:1:1; 4:2:1; 2:1:2; 4:1:2; 2:2:1 y 2:1:2:1. Es preferente el uso de una masa sustancialmente igual de cada sacárido.

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

La fragmentación de polisacáridos se realiza preferentemente para dar un grado final medio de polimerización (dP) en el oligosacárido de menos de 30 (por ejemplo, entre 10 y 20, preferentemente alrededor de 10 para el serogrupo A; entre 15 y 25 para los serogrupos W135 e Y, preferentemente alrededor de 15-20; entre 12 y 22 para el serogrupo C, etc.). DP puede medirse convenientemente mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante ensayos colorimétricos [194].

Si se realiza hidrólisis, el hidrolisado tendrá generalmente el tamaño para eliminar los oligosacáridos de longitud corta [195]. Esto puede conseguirse de varias maneras, 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 eliminan preferentemente para el serogrupo A, y aquellos inferiores a aproximadamente 4 se eliminan preferentemente para los serogrupos W135 e Y.

Los antígenos de sacárido MenC preferentes se desvelan en la referencia 5, como los usados en Menjugate™.

Los sacáridos se preparan preferentemente por separado (incluyendo cualquier fragmentación, conjugación, modificación, etc.) y después se mezclan para dar una composición de la invención.

Donde la composición comprende sacárido capsular del serogrupo A, en cambio, es preferente que el sacárido del serogrupo A no se combine con otro u otros sacáridos hasta poco antes de su uso, con el fin de minimizar el potencial para hidrólisis. Esto puede conseguirse convenientemente teniendo el componente del serogrupo A (típicamente con los excipientes apropiados) en forma liofilizada y el otro u otros componentes del serogrupo en forma líquida (también con los excipientes adecuados), usándose los componentes líquidos para reconstituir los componentes de MenA liofilizados cuando estén listos para su uso. Donde se usa un adyuvante de sal de aluminio, es preferente incluir el adyuvante en el vial que lo contiene con la vacuna líquida, y liofilizar el componente de MenA sin adyuvante. Una composición de la invención puede de este modo prepararse a partir de un kit que comprende: (a) sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo A, en forma liofilizada; y (b) más antígenos de la composición, en forma líquida:

Conjugación covalente

Los sacáridos capsulares en composiciones de la invención se conjugarán normalmente con la proteína o proteínas portadoras. En general, la conjugación mejora la inmunogenicidad de sacáridos ya que los convierte de antígenos T-independientes a antígenos T-dependientes, permitiendo de este modo la estimulación de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas y es una técnica bien conocida [por ejemplo, analizado en las refs. 196 y 167-175].

Las proteínas portadoras preferentes son toxinas bacterianas o toxoides, tal como toxoide de difteria o toxoide de tétano. La mutante de toxina de difteria CRM₁₉₇ [197-199] es particularmente preferente. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa *N. meningitidis* [200], péptidos sintéticos [201, 202], proteínas de choque térmico [203, 204], proteínas de pertussis [205, 206], citoquinas [207], linfoquinas [207], hormonas [207],

factores del crecimiento [207], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopes celulares CD4+ humanos de varios antígenos derivados de patógenos [208], proteína D de *H. influenzae* [209, 210], proteína de superficie neumocócica PspA [211], proteínas de absorción de hierro [212], toxina A y B de *C. difficile* [213], etc. Los portadores preferentes son toxoide de difteria, toxoide de tétano, proteína D *H. influenzae* y CRM₁₉₇.

Dentro de una composición de la invención, es posible usar más de una proteína portadora, por ejemplo, para reducir el riesgo de supresión de portadores. De este modo, 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 de tétano. También es posible usar más de una proteína portadora para un antígeno de sacárido particular, por ejemplo, los sacáridos del serogrupo A podrían estar en dos grupos, con algunos conjugado con CRM₁₉₇ y otros con el toxoide de tétano. Sin embargo, en general es preferente usar la misma proteína portadora para todos los sacáridos.

Una única proteína portadora puede transportar más de un antígeno de sacárido [214]. Por ejemplo, una única proteína portadora podría haberse conjugado con su sacárido de los serogrupos A y C. Para conseguir este objetivo, los sacáridos pueden mezclarse antes de la reacción de conjugación. Sin embargo, en general es preferente tener conjugados separados para cada serogrupo.

Los conjugados con la una proporción sacárido:proteína (p/p) de entre 1:5 (es decir, exceso de proteína) y 5:1 (es decir, exceso de sacárido) son preferentes. Las proporciones entre 1:2 y 5:1 son preferentes, como las proporciones entre 1:1,25 y 1:2,5 son más preferentes. La proteína portadora en exceso puede ser preferentes para MenA y MenC.

Los conjugados podrían usarse en conjunto con una proteína portadora libre [215]. Cuando una proteína portadora dada está presente tanto en forma libre como en forma conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es preferentemente no superior al 5% de la cantidad total de la proteína portadora en la composición como un todo, y más preferentemente está presente en menos del 2% por peso.

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

El sacárido normalmente se activará o funcionalizará antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reagentes cianilantes tales como CDAP (por ejemplo, 1-ciano-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato [216-217, etc.]. Otras técnicas adecuadas usan carbodimidas, hidracidas, ésteres activos, norbornoano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 173).

Las uniones a través de un enlazante pueden usarse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 218 y 219. Otro tipo de unión implica la aminación reductiva del polisacárido, acoplando el grupo amino resultante con un extremo del grupo enlazante de ácido adípico, y después acoplando una proteína al otro extremo del grupo enlazante de ácido adípico [171, 220, 221]. Otros enlazantes incluyen B-propionamido [222], nitrofenil-etilamina [223], haluros de haloacilo [224], uniones glicosídicas [225], ácido 6-aminocaproico [226], ADH [227], fracciones C₄ a C₁₂ [228], etc. Como alternativa a usar un enlazante, puede usarse una unión directa. Las uniones directas con la proteína pueden comprender la oxidación del polisacárido seguida de una aminación reductiva con la proteína, como se describe, por ejemplo, en las referencias 229 y 230.

Un proceso que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, sustituyendo los grupos de terminal =O por -NH₂) seguida de la derivación con un diéster adípico (por ejemplo, N-hidroxisuccinimido diéster de ácido adípico) y la reacción con la proteína portadora es preferente. Otra reacción preferente usa la activación CAP con un portador de proteína D, por ejemplo, para MenA o MenC.

Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados pueden separarse. Hay muchos métodos adecuados, incluyendo cromatografía hidrofílica, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [véase también refs. 231 y 232, etc.

Donde la composición de la invención incluye un oligosacárido conjugado, es preferente que la preparación de oligosacárido preceda a la conjugación.

Como alternativa a la purificación, los sacáridos capsulares pueden obtenerse mediante síntesis total o parcial, por ejemplo, la síntesis de Hib se desvela en la ref. 233, y la síntesis de MenA en la ref. 234.

Antígenos de polipéptido de serogrupo B adicionales y alternativos

La invención usa una composición que, después de su administración a un sujeto, es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en ese sujeto, en el que la respuesta de anticuerpos es protectora contra al menos el serogrupo Y de meningococo. Aunque NadA, 741, 936, 953 y 287 son antígenos preferentes para conseguir esta protección, otros antígenos de polipéptido MenB que pueden incluirse adicionalmente en composiciones de la invención en combinación con uno o más de NadA, "287" o "741" incluyen aquellos que comprende una de las siguientes secuencias de aminoácido: SEQ ID NO: 650 de ref. 15; SEQ ID NO: 878 de ref. 15; SEQ ID NO: 884 de ref. 15; SEQ

5 ID NO: 4 de ref. 16; SEQ ID NO: 598 de ref. 17; SEQ ID NO: 818 de ref. 17; SEQ ID NO: 864 de ref. 17; SEQ ID NO: 866 de ref. 17; SEQ ID NO: 1196 de ref. 17; SEQ ID NO: 650 de ref. 15; SEQ ID NO: 650 de ref. 15; SEQ ID NO: 650 de ref. 15; SEQ ID NO: 650 de ref. 15; SEQ ID NO: 1272 de ref. 17; SEQ ID NO: 1274 de ref. 17; SEQ ID NO: 1640 de ref. 17; SEQ ID NO: 1788 de ref. 17; SEQ ID NO: 2288 de ref. 17; SEQ ID NO: 2466 de ref. 17; SEQ ID NO: 2554 de ref. 17; SEQ ID NO: 2576 de ref. 17; SEQ ID NO: 2606 de ref. 17; SEQ ID NO: 2608 de ref. 17; SEQ ID NO: 2616 de ref. 17; SEQ ID NO: 2668 de ref. 17; SEQ ID NO: 2780 de ref. 17; SEQ ID NO: 2932 de ref. 17; SEQ ID NO: 2958 de ref. 17; SEQ ID NO: 2970 de ref. 17; SEQ ID NO: 2988 de ref. 17 o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que: (a) tiene 50% de identidad o más (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, en los 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 preferentes para (b) comprenden un epítipo de la secuencia relevante. Pueden incluirse más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6) de estos polipéptidos.

15 La proteína de enlace a transferina de antígenos y/o proteína HsF también pueden usarse [235]. La proteína NspA también puede usarse [236], preferentemente expresada de manera recombinante y purificada como en la referencia 237.

General

20 La expresión “que comprende” engloba “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, $x \pm 10\%$.

25 El término “sustancialmente” no excluye “completamente”, por ejemplo, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Donde sea necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

30 Las referencias a una identidad de secuencia porcentual entre dos secuencias de aminoácidos significan que, cuando se alinean, ese porcentaje de aminoácidos es el mismo en comparación con las dos secuencias. Esta alineación y la homología porcentual o identidad de secuencia pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en la sección 7.7.18 de la referencia 238. Una alineación preferente se determina por el algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman usando una búsqueda de espacio afín con una penalización de espacio libre de 12 y una penalización de extensión de espacio de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman se muestra en la referencia 239.

40 El término “polipéptido” se refiere generalmente a un polímero de residuos de aminoácido, y no se limita a una longitud mínima del producto. De este modo, los péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares se incluyen dentro de la definición. La definición engloba tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas. Típicamente, los polipéptidos útiles en esta invención pueden tener una longitud máxima adecuada para la aplicación planeada. Generalmente, la longitud máxima no es fundamental y un experto en la técnica puede seleccionarla fácilmente.

45 Los polipéptidos de la invención pueden prepararse de muchas maneras, por ejemplo, mediante síntesis química (al menos en parte), digiriendo polipéptidos más largos usando proteasas, mediante traslación de ARN, mediante purificación de cultivo celular (por ejemplo, de expresión recombinante), del propio organismo (por ejemplo, después del cultivo bacteriano), de una fuente de línea celular, etc. Un método preferente para la producción de péptidos con < 40 aminoácidos de largo implica la síntesis química *in vitro* [240, 241]. La síntesis del péptido en fase sólida es particularmente preferente, tales como los métodos basados en química tBoc o Fmoc [242]. La síntesis enzimática [243] puede también usarse en parte o en su integridad. Como alternativa a la síntesis química, puede usarse la síntesis biológica, por ejemplo, los polipéptidos pueden producirse mediante traslación. Esto puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. Los métodos biológicos se restringen en general a la producción de polipéptidos basados en L-aminoácidos, pero la manipulación de la maquinaria de traslación (por ejemplo, de moléculas tARN de aminoácido) puede usarse para permitir la introducción de D-aminoácidos (o de otros aminoácidos no naturales, tales como iodotirosina o metilfenilalanina, acidohomoalanina, etc.) [244]. Sin embargo, donde se incluyen D-aminoácidos es preferente usar síntesis química. Los polipéptidos de la invención pueden tener modificaciones covalentes en la C-terminal y/o N-terminal.

60 Los polipéptidos usados en la invención pueden tomar varias formas (por ejemplo, nativos, fusiones, glicosilados, no glicosilados, lipidados, no lipidados, fosforilados, no fosforilados, miristoilados, no miristoilados, monoméricos, multiméricos, particulados, desnaturalizados, etc.). Un polipéptido purificado está separado y distinto del organismo completo en el que se expresó.

65 El término “ácido nucleico” incluye en términos generales una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que contienen deoxiribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o sus análogos. Incluye ADN, ARN, híbridos ADN/ARN. También incluye análogos de ADN o ARN, tales como los que contienen esqueletos modificados (por ejemplo,

ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) o fosforotioatos) o bases modificadas. De este modo, la invención incluye mARN, tARN, rARN, ribozimas, ADN, cADN, ácidos nucleicos recombinantes, ácidos nucleicos ramificados, plásmidos, vectores, sondas, cebos, etc. Donde el ácido nucleico de la invención toma la forma de ARN, puede o no tener una tapa 5'.

Los ácidos nucleicos pueden prepararse de muchas maneras, por ejemplo, mediante síntesis química (al menos en parte), digiriendo ácidos nucleicos más largos usando nucleasas (por ejemplo, enzimas de restricción), uniendo ácidos nucleicos más cortos (por ejemplo, usando ligasas o polimerasas), de bibliotecas genómicas o cADN, etc.

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

MODOS PARA REALIZAR LA INVENCION

Polipéptidos

Se prepararon el polipéptido híbrido Δ G287-953, el polipéptido híbrido 936- Δ G741 y el polipéptido NadA(NL)(C) como se desvela en la referencia 24. Estos polipéptidos se codifican mediante secuencias tomadas de los genomas de la cepa serogrupo B de meningococo.

Los tres polipéptidos se mezclaron para dar una formulación recombinante, incluyendo un adyuvante de hidróxido de aluminio. La formulación se uso para inmunizar ratones, y títulos bactericidas de sueros inmunes se evaluaron contra cepas meningocócicas en los serogrupos A, B, C, W135 e Y. Los resultados contra 11 cepas fueron los siguientes.

Serogrupo	B				A	C	W135	Y			
Cepa	2996	MC58	394/98	44/76	F6124	C11	LPN17592	860800	ES13822	ES15085	ES14487
Título SBA	1024	4096	1024	8192	2048	2048	512	65536	4096	4096	4096

De este modo, la composición mezclada fue efectiva al cultivar sueros que eran bactericidas contra el serogrupo B, que es el serogrupo de origen para las secuencias de aminoácido incluidas en el polipéptido. Se vieron títulos en el mismo intervalo contra los serogrupos A y c, y se vieron títulos ligeramente inferiores contra el serogrupo W. sorprendentemente, los títulos más altos se vieron contra cepas en el serogrupo Y.

Además, los títulos vistos contra las cepas del serogrupo Y fueron equivalentes a los obtenidos usando una vacuna conjugada tetravalente A/C/W135/Y [8].

Cepa	860800	ES13822	ES15085	ES14487
Polipéptidos	65536	4096	4096	4096
Conjugados tetravalentes	32768	>8192	>8192	4096

De este modo, por primera vez, los inventores han conseguido respuestas inmunes efectivas contra cepas meningocócicas para cada uno de los serogrupos patogénicos (A, B, C, W135 e Y) usando antígenos polipeptídicos y sin usar sacáridos capsulares.

Se entenderá que la invención se ha descrito solamente a modo de ejemplo y que pueden hacerse modificaciones mientras se mantenga dentro del alcance de la invención.

REFERENCIAS

- [1] Maiden *et al.* (1998) *PNAS USA* 95:3140-3145.
- [2] Armand *et al.* (1982) *J. Biol. Stand.* 10:335-339.
- [3] Cadoz *et al.* (1985) *Vaccine* 3:340-342.
- [4] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [5] Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-8.
- [6] Lieberman *et al.* (1996) *JAMA* 275:1499-503.
- [7] WO02/058737.
- [8] WO03/007985.
- [9] Rennels *et al.* (2002) *Pediatr Infect Dis J* 21:978-979.
- [10] Campbell *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186:1848-1851.
- [11] Patente Europea 0939647.
- [12] Parkhill *et al.* (2000) *Nature* 404:502-506.
- [13] Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [14] WO00/66791.
- [15] WO99/24578.
- [16] WO99/36544.

- [17] WO99/57280.
- [18] WO00/22430.
- [19] WO00/66741.
- 5 [20] Pizza *et al.* (2000) *Science* 287:1816-1820.
- [21] WO01/64920.
- [22] WO01/64922.
- [23] WO03/020756.
- [24] WO2004/032958.
- 10 [25] Commanducci *et al.* (2002) *J. Exp. Med.* 195:1445-1454.
- [26] WO03/010194.
- [27] WO2004/048404.
- [28] WO03/063766.
- [29] Masignani *et al.* (2003) *J Exp Med* 197:789-799.
- [30] WO02/09643.
- 15 [31] Katia *et al.* (2003) *J Ex Med* 197:789-799.
- [32] WO01/52885
- [33] Patente Europea 0301992.
- [34] Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- [35] Fukasawa *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- 20 [36] WO02/09746
- [37] Rosenqvist *et al.* (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- [38] WO01/09350.
- [39] Patente Europea 0449958.
- [40] EP-A-0996712.
- 25 [41] EP-A-0680512.
- [42] WO2004/014477.
- [43] WO02/062378.
- [44] WO99/59625.
- [45] Patente Estados Unidos 6.180.111.
- 30 [46] WO01/34642.
- [47] WO03/051379.
- [48] Patente de Estados Unidos 6.558.677.
- [49] WO2004/019977.
- [50] WO02/062380.
- 35 [51] WO2004/002523.
- [52] WO00/25811.
- [53] WO2004/015099.
- [54] WO03/105890.
- [55] Peeters *et al.* (1996) *Vaccine* 14:1008-1015.
- 40 [56] Vermont *et al.* (2003) *Infect Immun* 71:1650-1655.
- [57] Holmes *et al.* (1999) *Mol Biol Evol* 16:741-749.
- [58] Masignani *et al.* (2001) *Infect Immun* 69:2580-2588.
- [59] Maslanka *et al.* (1997) *Clin Diagn Lab Immunol* 4:156-167.
- [60] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
- 45 [61] Petterson *et al.* (1994) *Microb Pathog* 17(6):395-408.
- [62] Welsch *et al.* (2002) Decimotercera Conferencia Internacional de Neisseria Patológica, Instituto noruego de Salud Pública, Oslo, Noruega; Sept. 1-6, 2002. *Antígeno derivado de genoma (ADG) 2132 obtiene anticuerpos de suero protector para las cepas de Neisseria meningitidis de grupos B y C.*
- [63] Santos *et al.* (2002) Decimotercera Conferencia Internacional de Neisseria Patológica, Instituto noruego de Salud Pública, Oslo, Noruega; Sept. 1-6, 2002. *Respuestas bactericidas de suero en macacos Rhesus inmunizados con vacunas nuevas que contienen proteínas recombinantes derivadas del genoma de N. meningitidis.*
- 50 [64] WO03/009869.
- [65] WO01/30390.
- [66] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- 55 [67] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.
- [68] WO00/53221.
- [69] Jakobsen *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.
- [70] Wu *et al.* (1997) *J Infect Dis* 175:839-846.
- [71] Bergquist *et al.* (1998) *APMIS* 106:800-806.
- 60 [72] Baudner *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.
- [73] Ugozzoli *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.
- [74] Paoletti *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
- [75] WO00/56365.
- [76] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- 65 [77] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [78] WO00/23105.

- [79] WO90/14837.
 [80] Patente de Estados Unidos 5.057.540.
 [81] WO96/33739.
 [82] EP-A-0109942.
 5 [83] WO96/11711.
 [84] WO00/07621.
 [85] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
 [86] Sjolander *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
 10 [87] Nikura *et al.* (2002) *Virology* 293:273-280.
 [88] Lenz *et al.* (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
 [89] Pinto *et al.* (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
 [90] Gerber *et al.* (2001) *Virology* 75:4752-4760.
 [91] WO03/024480.
 [92] WO03/024481.
 15 [93] Gluck *et al.* (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
 [94] EP-A-0689454.
 [95] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2773-2778.
 [96] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
 [97] Meraldi *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
 20 [98] Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
 [99] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
 [100] WO02/26757.
 [101] WO99/62923.
 [102] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
 25 [103] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
 [104] WO98/40100.
 [105] Patente de Estados Unidos 6.207.646.
 [106] Patente de Estados Unidos 6.239.116.
 [107] Patente de Estados Unidos 6.429.199.
 30 [108] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3):654-658.
 [109] Blackwell *et al.* (2003) *BBRC* 300:
 [110] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
 [111] WO01/95935.
 [112] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
 35 [113] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
 [114] WO03/035836.
 [115] WO95/17211.
 [116] WO98/43375.
 [117] Beignon *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
 40 [118] Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
 [119] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
 [120] Scharton-Kersten *et al.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
 [121] Ryan *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
 [122] Partidos *et al.* (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
 45 [123] Peppoloni *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
 [124] Pine *et al.* (2002) *J Control Release* 85:263-270.
 [125] Domeringhini *et al.* (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
 [126] WO99/40936.
 [127] WO99/44636.
 50 [128] Singh *et al.* (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
 [129] WO99/27960.
 [130] Patente de Estados Unidos 6.090.406.
 [131] Patente de Estados Unidos 5.916.588.
 [132] EP-A-0626169.
 55 [133] WO99/52549
 [134] WO01/21207
 [135] WO01/21152
 [136] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
 [137] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-ñ196
 60 [138] Stanley *et al.* (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
 [139] Jones *et al.* (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
 [140] WO99/11241
 [141] WO94/00153
 [142] WO98/57659
 65 [143] Solicitudes de Patente Europea 0835318, 0735898 y 0761231.
 [144] WO96/37222; Patente de Estados Unidos 6.333.036.

- [145] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [146] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [147] Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Supl:S63-68 & 79-80.
- [148] *Vaccines* (1998) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- 5 [149] Del Giudice *et al.* (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- [150] Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med* 334:349-355.
- [151] Rappuoli *et al.* (1991). *TIBTECH* 9:232-238.
- [152] WO01/52885.
- [153] Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- 10 [154] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [155] Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-480.
- [156] Donnelly *et al.* (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
- [157] Scott-Taylor & Dangleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
- [158] Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
- 15 [159] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
- [160] Dubensky *et al.* (2000) *Mol Med* 6:723-732.
- [161] Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
- [162] Donnelly *et al.* (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.
- [163] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med* 66:84-90.
- 20 [164] Charalambous & Feavers (2001) *J Med Microbiol* 50:937-939.
- [165] Westerink (2001) *Int Rev Immunol* 20:251-261.
- [166] Grothaus *et al.* (2000) *Vaccine* 18:1253-1263.
- [167] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Supl 2:S28-36.
- [168] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physician Lond* 34:163-168.
- 25 [169] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- [170] Goldblatt (1998) . *Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [171] Patente Europea 0477508.
- [172] Patente de Estados Unidos 5.306.492.
- [173] WO98/42721.
- 30 [174] Dick *et al.* en *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [175] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [176] Kanra *et al.* (1999) *The Turkish Journal of Pediatrics* 42:421-427.
- [177] Ravenscroft *et al.* (2000) *Dev Biol (BASel)* 103: 35-47.
- [178] WO97/00697.
- 35 [179] WO02/00249.
- [180] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [181] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [182] Jedrejas (2001) *Microbiol Mol Bio Rev* 65:187-207.
- [183] Zielen *et al.* (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.
- 40 [184] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
- [185] Tettelin *et al.* (2001) *Science* 293:498-506.
- [186] Hoskins *et al.* (2001) *J Bacteriol* 183:5709-5717.
- [187] Rappuoli (2000) *Curr Opin Microbiol* 3:445-450.
- [188] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19:2688-2691.
- 45 [189] Masignani *et al.* (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:895-905.
- [190] Mora *et al.* (2003) *Drug Discov Today* 8:459-464.
- [191] Witzemann *et al.* (2001) *Infect Immun* 69:1593-1598.
- [192] Rigden *et al.* (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:143-168.
- [193] WO02/22167
- 50 [194] Ravenscroft *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- [195] Costantino *et al.* (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [196] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357 (9251):195-196.
- [197] Anonymous (Enero 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [198] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- 55 [199] Anderson *et al.* (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- [200] EP-A-0372501.
- [201] EP-A-0378881.
- [202] EP-A-0427347.
- [203] WO93/17712.
- 60 [204] WO94/03208.
- [205] WO98/58668.
- [206] EP-A-0471177.
- [207] WO91/01146.
- [208] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- 65 [209] EP-A-0594610.
- [210] WO00/56360.

- [211] WO02/091998.
 [212] WO01/72337.
 [213] WO00/61761.
 [214] WO99/42130.
 5 [215] WO96/40242.
 [216] Lees *et al.* (1996) *Vaccine* 14:190-198.
 [217] WO95/08348.
 [218] Patente de Estados Unidos 4.882.317.
 [219] Patente de Estados Unidos 4.695.624.
 10 [220] Porro *et al.* (1985) *Mol Immunol* 22:907-919.s.
 [221] EP-A-0208375.
 [222] WO00/10599.
 [223] Gever *et al.* *Med. Microbiol. Immunol*, 165: 171-288 (1979).
 [224] Patente de Estados Unidos 4.057.685.
 15 [225] Patentes de Estados Unidos 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
 [226] Patente de Estados Unidos 4.459.286.
 [227] Patente de Estados Unidos 4.965.338.
 [228] Patente de Estados Unidos 4.663.160.
 [229] Patente de Estados Unidos 4.761.283.
 20 [230] Patente de Estados Unidos 4.356.170.
 [231] Lei *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
 [232] WO00/38711; Patente de Estados Unidos 6.146.902.
 [233] Kandil *et al.* (1997) *Glycoconj J* 14:13-17.
 [234] Berkin *et al.* (2002) *Chemistry* 8:4424-4433.
 25 [235] WO2004/014419.
 [236] Martin *et al.* (2000) *J Biotechnol* 83:27-31.
 [237] WO2004/020452.
 [238] *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel *et al.*, eds. 1987) Suplemento 30.
 [239] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
 30 [240] Bodanszky (1993) *Principles of Peptide Synthesis* (ISBN: 0387564314).
 [241] Fields *et al.* (1997) *Meth Enzymol* 289: *Solid-Phase Peptide Synthesis*. ISBN: 0121821900.
 [242] Chan & White (2000) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*. ISBN: 0199637245.
 [243] Kullmann (1987) *Enzymatic Peptide Synthesis*. ISBN: 0849368413.
 [244] Ibba (1996) *Biotechnol Genet Eng Rev* 13:197-216.
 35 [245] WO90/11367.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 – NadA de cepa 2996, con supresión de C-terminal

40 MKHFPKSVLTTAILATFCSGALAAATNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDF
 KGLGLKKVVTNLTKTVNENKQNVDAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALDATTNALNKLGENITTFEETKTNIV
 KIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAETAAGKAEAAAGTANTAAD
 45 KAEAVAAKVTDIKADIATNKDNI AKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDKTVS
 DLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVG

SEQ ID NO: 2 - NadA de cepa 2996, con supresión de C-terminal y péptido líder procesado

50 ATNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVNENKQNV
 DAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFEETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDI
 ADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEAVAAKVTDIKADIATNKDNI
 AKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDKTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPY
 NVG

SEQ ID NO: 3 - ΔG741 de cepa MC58

55 VAADIGAGLADALTAPLDHKDGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS RFDFIRQIEVDGQL
 ITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYT
 IDFAAQQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIG
 LAAKQ

SEQ ID NO: 4 – 936 de cepa MC58 con péptido líder procesado

VSAVIGSAAVGAksAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGG
IARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAQITQKVST
TVGVQKVITLYQNYVQR

5

SEQ ID NO: 5 – 953 de cepa MC58 con péptido líder procesado

ATYKVDEYHANARFAIDHFNSTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPIANLQSGSQHFTDHLKSADIFDAAQYPDIR
FVSTKFNFGKLVSV DGNLTMHGKTAPVKLKAKEFNQYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGMDYLVNVGMTKSVRIDIQ
IEAAKQ

10

SEQ ID NO: 6 – ΔG287 de cepa MC58

SPDVKSADTLSPAAPVSEKETEAKEDAPQAGSQGQAPSAGSQDMAAVSEENTGNGGAVTADNPKNEDEVAQNMPQN
AAGTDSSTPNHTPDNMLAGNMENQATDAGESSQANQPDMAADGMQGGDPSAGGQAGNTAAQGANQAGNNQAAGSSD
PIPASNPAPANGGSNFRVLDLANGVLDGPSQNTLTHCKGDCSGNNFLDEEVQLKSEFEKLSADAKISNYKKDGKNDKF
VGLVADSVQMKGINQYIIIFYKPKPSTFARFRRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNRYRL
TYGAELPGGSYALRVQGEPAKGEMLAGAAVYNGEVLHFHTENGRPYPTRGRFAAKVDGSKSVDDGIIDSGDDLHMGTOQF
KAAIDGNGFKGTWTEGSGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD

15

SEQ ID NO: 7 – híbrido 287-953

MASPDVKSADTLSPAAPVSEKETEAKEDAPQAGSQGQAPSAGSQDMAAVSEENTGNGGAAATDKPKNEDEGAQNMP
QNAADTDSLTPNHTPASNPAGNMENQAPDAGESEQPANQPDMAADGMQGGDPSAGGENAGNTAAQGTNQAENNTAGS
QNPASSTNPSATNSGGDFGRNTVGNVVIDGPSQNTLTHCKGDCSGNNFLDEEVQLKSEFEKLSADAKISNYKKDGKND
GKNDKFVGLVADSVQMKGINQYIIIFYKPKPSTFARFRRSARSRRSLPAEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPE
GNRYRLTYGAELPGGSYALRVQGEPSKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPSRGRFAAKVDGSKSVDDGIIDSGDGLH
MGTQKFAAIDGNGFKGTWTEGSGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQDGSGGGGATYKVDEYHA
NARFAIDHFNSTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIPVANLQSGSQHFTDHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFG
KKLVSV DGNLTMHGKTAPVKLKAKEFNQYQSPMAKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ*

25

SEQ ID NO: 8 – híbrido 936-741

MVSAVIGSAAVGAksAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQNNQTKGYTPQISVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVG
QIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAQITQKVS
TTTVGVQKVITLYQNYVQRGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSL
TGKLNKDKVSRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLP
EGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDFAAQGNGKIEHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGI
FGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ*

30

SEQ ID NO: 9 – enlazante

GSGGGG

35

SEQ ID NO: 10 – secuencia 741

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDIFIR
IEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLP
GGKLYTTIDFAAQGNGKIEHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTV
NGIRHIGLAAKQ

40

SEQ ID NO: 11 – secuencia 741

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRO
IEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAG
GKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGE
KVHEIGIAGKQ

5

SEQ ID NO: 12 – secuencia 741

CSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSPQNGTLTSLAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKI
SRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGK
AFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAG
SATVKIGEKVHEIGIAGKQ

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende uno o más polipéptidos inmunogénicos de *Neisseria meningitidis* serogrupo B para su uso en un método de inmunización de un sujeto contra infección por serogrupo Y de *Neisseria meningitidis*, en la que los polipéptidos incluyen 1, 2, ó 3 de:
 - (i) una proteína NadA, que (a) tiene 80% o más identidad con SEQ ID NO: 2 o (b) comprende un fragmento de al menos 20 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1, donde el fragmento comprende un epítipo;
 - 10 (ii) una proteína "741", que (a) tiene 80% o más identidad con SEQ ID NO: 3 o (b) comprende un fragmento de al menos 20 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 3, donde el fragmento comprende un epítipo;
 - y/o
 - 15 (iii) una proteína "287", que (a) tiene 80% o más identidad con SEQ ID NO: 6 o (b) comprende un fragmento de al menos 20 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 6, donde el fragmento comprende un epítipo;
- 20 2. La composición de la reivindicación 1 para su uso en la reivindicación 1, que comprende la proteína NadA, la proteína "741", la proteína "287", y:
 - (iv) una proteína "936", que (a) tiene 80% o más identidad con SEQ ID NO: 4 o (b) comprende un fragmento de al menos 20 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 4, donde el fragmento comprende un epítipo; y
 - 25 (v) una proteína "953", que (a) tiene 80% o más identidad con SEQ ID NO: 5 o (b) comprende un fragmento de al menos 20 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 5, donde el fragmento comprende un epítipo;
- 30 3. La composición de la reivindicación 2 para su uso como en la reivindicación 2, que comprende una preparación de vesícula de membrana externa a partir de *N. meningitidis* serogrupo B.
- 35 4. La composición de cualquier reivindicación precedente para su uso como en cualquier reivindicación precedente, donde la composición incluye un polipéptido que tiene secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 2.
5. La composición de cualquier reivindicación precedente para su uso como en cualquier reivindicación precedente, donde la composición incluye un polipéptido que tiene secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 7.
- 40 6. La composición de cualquier reivindicación precedente para su uso como en cualquier reivindicación precedente, donde la composición incluye un polipéptido que tiene secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 8.
7. La composición de cualquier reivindicación precedente para su uso como en cualquier reivindicación precedente, donde la composición incluye más de una variante de proteína "741".
- 45 8. La composición de la reivindicación 7 para su uso como en la reivindicación 7, que incluye al menos dos de: (a) una primera proteína, que comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10; (2) una segunda proteína, que comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 11; y (3) una tercera proteína, que comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 12.
- 50 9. La composición de cualquier reivindicación precedente para su uso como en cualquier reivindicación precedente, donde la composición incluye un adyuvante de hidróxido de aluminio.
10. La composición de cualquier reivindicación precedente para su uso como en cualquier reivindicación precedente, donde la composición incluye un adyuvante de fosfato de aluminio.
- 55 11. La composición de cualquier reivindicación precedente para su uso como en cualquier reivindicación precedente y también para su uso en la inmunización de un sujeto contra infección de serogrupo A, B, C y/o W135 o *N. meningitidis*.
- 60 12. La composición de cualquier reivindicación precedente para su uso como en cualquier reivindicación precedente, donde dicha composición no incluye un sacárido capsular del serogrupo Y.
13. El uso de uno o más polipéptidos inmunogénicos de *Neisseria meningitidis* serogrupo B en la fabricación de un medicamento para inmunizar un sujeto contra infección por serogrupo Y de *Neisseria meningitidis*, donde los polipéptidos incluyen 1, 2 ó 3 de:

- (i) una proteína NadA, que (a) tiene 80% o más identidad con SEQ ID NO: 2 o (b) comprende un fragmento de al menos 20 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1, donde el fragmento comprende un epítipo;
- 5 (ii) una proteína “741”, que (a) tiene 80% o más identidad con SEQ ID NO: 3 o (b) comprende un fragmento de al menos 20 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 3, donde el fragmento comprende un epítipo;
- y/o
- 10 (iii) una proteína “287”, que (a) tiene 80% o más identidad con SEQ ID NO: 6 o (b) comprende un fragmento de al menos 20 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 6, donde el fragmento comprende un epítipo.
14. El uso de la reivindicación 13, donde el medicamento es una composición como la definida en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10.
- 15 15. El uso de la reivindicación 13 o reivindicación 14, en la fabricación de un medicamento para inmunizar un sujeto también contra infección por el serogrupo A, B, C y/o W135 o *N. meningitidis*.