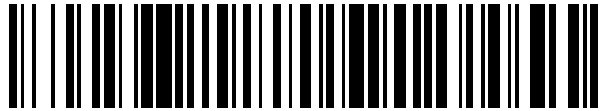


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 251**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2003 E 03784153 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 1524993**

54 Título: **Composiciones de vacuna contra Neisseria que comprenden una combinación de antígenos**

30 Prioridad:

02.08.2002 GB 0218037 02.08.2002 GB 0218036
02.08.2002 GB 0218035 02.08.2002 GB 0218051
30.08.2002 GB 0220197 30.08.2002 GB 0220199
01.11.2002 GB 0225524 01.11.2002 GB 0225531
24.12.2002 GB 0230164 24.12.2002 GB 0230168
24.12.2002 GB 0230170 05.03.2003 GB 0305028

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2013

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART BRUSSELS, BE

72 Inventor/es:

BERTHET, FRANCOIS-XAVIER,JACQUES;
BIEMANS, RALPH;
DENOEL, PHILIPPE;
FERON, CHRISTIANE;
GORAJ, CARINE;
POOLMAN, JAN y
WEYNANTS, VINCENT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 408 251 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

Composiciones de vacuna contra Neisseria que comprenden una combinación de antígenos

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere al campo de composiciones inmunogénicas de Neisseria y vacunas, a su fabricación y al uso de dichas composiciones en medicina. Más particularmente, se refiere a composiciones de vacuna que comprenden una combinación de antígenos que tienen cualidades que permiten que las vacunas de la invención provoquen una respuesta inmune sorprendentemente buena medida en un ensayo de protección o en un ensayo bactericida en suero.

Antecedentes

- 10 Las cepas de bacterias de Neisseria son los agentes causantes de varias patologías humanas, contra las cuales existe la necesidad de desarrollar vacunas eficaces. En particular *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* causan patologías que podrían tratarse por vacunación.

- 15 *Neisseria gonorrhoeae* es el agente etiológico de la gonorrea, una de las enfermedades transmitidas por vía sexual más frecuentemente presentadas en el mundo con una incidencia anual estimada de 62 millones de casos (Gerbase y col 1998 Lancet 351; (Supl 3) 2-4). Las manifestaciones clínicas de la gonorrea incluyen la inflamación de las membranas mucosas del tracto urogenital, la garganta o el recto e infecciones oculares del neonato. Las infecciones por gonococos ascendentes en mujeres pueden conducir a infertilidad, embarazo ectópico, enfermedad inflamatoria pélvica crónica y formación de abscesos tubo-ováricos. La septicemia, la artritis, la endocarditis y la meningitis están asociadas con gonorrea complicada.

- 20 El elevado número de cepas de gonococos con resistencia a antibióticos contribuye a morbilidad aumentada y complicaciones asociadas con la gonorrea. Una alternativa atractiva al tratamiento de la gonorrea con antibióticos sería su prevención usando vacunación. Actualmente no existe ninguna vacuna para infecciones por *N. gonorrhoeae*.

- 25 *Neisseria meningitidis* es un patógeno importante, particularmente en niños y adultos jóvenes. La septicemia y la meningitis son las formas más amenazantes de la vida de enfermedad invasiva por meningococos (EIM). Esta enfermedad ha llegado a ser un problema de salud mundial a causa de su elevada morbilidad y mortalidad.

- 30 Se han identificado trece serogrupos de *N. meningitidis* en base a diferencias antigénicas en los polisacáridos capsulares, siendo los más habituales A, B y C, que son responsables del 90% de las enfermedades en todo el mundo. El serogrupo B es la causa más común de enfermedad por meningococos en Europa, Estados Unidos y varios países de América latina.

- 35 Se han desarrollado vacunas basadas en el polisacárido capsular de los serogrupos A, C, W e Y, y han demostrado controlar brotes de enfermedad por meningococos (Peltola y col 1985 Pediatrics 76; 91-96). Sin embargo, el serogrupo B es poco inmunogénico e induce solamente una respuesta de anticuerpo transitoria de, predominantemente, un isotipo IgM (Ala'Aldeen D y Cartwright K 1996, J. Infect. 33; 153-157). Por lo tanto no existe ninguna vacuna ampliamente eficaz, actualmente disponible, contra meningococos del serogrupo B, que es responsable de la mayoría de las enfermedades en la mayoría de los países de clima templado. Esto es particularmente problemático ya que la incidencia de enfermedades de serotipo B está aumentando en Europa, Australia y América, principalmente en niños menores de 5 años. El desarrollo de una vacuna contra meningococos del serogrupo B presenta dificultades particulares porque la cápsula polisacárida es poco inmunogénica debido a su similitud inmunológica con la molécula de adhesión celular neural humana. Por lo tanto las estrategias para la producción de vacunas se han concentrado en las estructuras expuestas en superficie de la membrana externa de meningococos, pero se ha visto impedida por la marcada variación en estos antígenos entre las cepas.

- 45 Desarrollos adicionales han conducido a la introducción de vacunas compuestas de vesículas de membrana externa que contendrán varias proteínas que componen el contenido normal de la membrana bacteriana. Una de éstas es la vacuna VA-MENGOC-BC ® cubana contra serogrupos B y C de *N. meningitidis* (Rodríguez y col 1999 Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 94; 433-440). Esta vacuna se diseñó para combatir un brote de enfermedad invasiva por meningococos en Cuba que no se había eliminado por un programa de vacunación usando una vacuna de polisacárido capsular AC. Los serogrupos prevalentes eran B y C y la vacuna VA-MENGOC-BC ® fue satisfactoria en el control del brote con una eficacia de vacuna estimada del 83% contra cepas del serogrupo B de *N. meningitidis* (Sierra y col 1990 In Neisseria, Walter Gruyter, Berlin, m. Atchman y col (eds) p 129-134, Sierra y col 1991, NIPH Ann 14; 195-210). Esta vacuna fue eficaz contra un brote específico, sin embargo la respuesta inmune provocada no protegería contra otras cepas de *N. meningitidis*.

- 55 Estudios de eficacia posteriores realizados en América latina durante epidemias causadas por cepas de meningococos homólogas y heterólogas de serogrupo B han demostrado alguna eficacia en niños mayores y adultos pero su eficacia fue significativamente inferior en niños más pequeños que estaban en mayor riesgo de infección (Milagres y col 1994, Infect. Immun. 62; 4419-4424). Es cuestionable cómo de eficaz sería dicha vacuna en países

con enfermedad endémica multicepa tal como el Reino Unido. Estudios de inmunogenicidad contra cepas heterólogas han demostrado actividad bactericida en suero de reacción cruzada solamente limitada, especialmente en bebés (Tappero y col 1999, JAMA 281; 1520-1527).

5 Se desarrolló una segunda vacuna de vesícula de membrana externa en Noruega usando un aislado de serotipo B típico de los prevalentes en Escandinavia (Fredriksen y col 1991, NIPH Ann, 14; 67-80). Esta vacuna se ensayó en ensayos clínicos y se encontró que tenía una eficacia protectora después de 29 meses del 57% (Bjune y col 1991, Lancet, 338; 1093-1096).

10 Sin embargo, el uso de vesículas de membrana externa en vacunas está asociado con algunos problemas. Por ejemplo, las VME contienen lipopolisacáridos tóxicos y pueden contener antígenos inmunodominantes que son específicos de cepa o se expresan de forma variable. Se han descrito varios procedimientos que podrían usarse para superar algunos de los problemas de las vacunas de preparación de vesícula de membrana externa. El documento WO01/09350 describe procedimientos que abordan algunos de estos problemas por ejemplo reduciendo la toxicidad y modificando los antígenos presentes en las vesículas de membrana externa.

15 Una vacuna de vesícula de membrana externa que comprende LPS y proteínas de membrana externa de clases 1, 3, 4 y 5 se desvela en Andersen y col 1997, Microbial Pathogenesis 23:139-155.

El documento WO01/52885 describe la posibilidad de combinar vesículas de membrana externa con otros antígenos y se incluye una lista de más de 2.000 proteínas potenciales de *Neisseria* a partir de las cuales se especula que podría desarrollarse una vacuna con eficacia contra un intervalo más amplio de serotipos.

20 Una vacuna de membrana externa nativa intranasal preparada a partir de una cepa negativa de cápsula de grupo B de *Neisseria meningitidis*, cultivada en condiciones limitantes de hierro para inducir proteínas reguladas por hierro, se desvela en Katial y col 2002, Infection and Immunity, 70:702-707.

Existen diversos problemas con las vacunas anti-meningococos actualmente disponibles.

25 Las vacunas de membrana externa basadas en proteína tienden a ser específicas y eficaces contra unas pocas cepas solamente. Las vacunas de polisacárido también son sub-óptimas ya que tienden a provocar respuestas inmunes pobres y cortas, particularmente contra el serogrupo B (Lepow y col 1986; Peltola 1998, Pediatrics 76; 91-96).

30 Las infecciones por *Neisseria* representan un problema sanitario considerable para el cual no hay vacunas disponibles en el caso de *N. gonorrhoeae* o están disponibles vacunas con limitaciones en su eficacia y capacidad para proteger contra cepas heterólogas en el caso de *N. meningitidis*. Existe claramente una necesidad de desarrollar vacunas superiores contra infecciones por *Neisseria* que mejoren la eficacia de las vacunas actualmente disponibles y permitan la protección contra un intervalo más amplio de cepas.

Descripción de las Figuras

35 Figura 1.- Detección de TbpA y Hsf en VME preparadas a partir de una cepa de *N. meningitidis* recombinante regulada positivamente para la expresión de *tbpA* y *hsf*. Separación de preparaciones de VME (10 µg) por análisis de SDS-PAGE (geles de gradiente del 4-20%) teñidas con azul brillante de Coomassie.

Figura 2.- Detección del dominio pasajero de Hsf recombinante producido en *E. coli*, 10 µg de proteína pasajera Hsf purificada (Carril 2 y 3) se separó por SDS-PAGE en un gel al 12% en comparación con un marcador de peso molecular (Carril 1).

40 Figura 3.- Análisis de la pureza de pasajero de Hap detectado por (A) tinción con Coomassie, (B) tinción con plata, (C) transferencia de Western anti-His5 y (D) *anti-E. coli*. Se separaron 10 µg de antígenos purificados por SDS-PAGE en un gel de gradiente de acrilamida del 4-20%.

Figura 4.- Regiones de similitud de secuencia compartidas por las proteínas FrpA y FrpC aisladas de la cepa de *N. meningitidis* FAM20. (A) Organización de dominios de las proteínas FrpA y FrpC de *N. meningitidis* cepa FAM20 RTX. (B) Productos de amplificación FrpA/C obtenidos de *N. meningitidis* cepa H44/76.

45 Figura 5.- Expresión de antígeno Frp23 recombinante (región conservada de FrpA/C con 23 repeticiones) en *E. coli*. Análisis de SDS-PAGE de extractos de células totales no inducidos (NI) e inducidos (I) de *E. coli* BL21DE3 transformada con vectores de control (pET24d) o construcciones recombinantes (Frp3, Frp13 y Frp23 respectivamente). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (A) o se transfirieron a nitrocelulosa y se inmunodetectaron con suero de ratón anti-His6.

50 Figura 6.- Secuencia de ADN preferida del fragmento FHAB 2/3° expresado en *E. coli*.

Figura 7.- Purificación de FHAB 2/3° recombinante de extractos de *E. coli* B121DE3 inducidos. (A) Etapas principales en el procedimiento de purificación. (B) Análisis de SDS-PAGE de fracciones proteicas muestreadas en diferentes etapas del procedimiento de purificación.

Figura 8.- Actividades de bloqueo de la adhesión de anti-sueros dirigidos contra los antígenos FHAB2/3°, Hap, dominio pasajero de Hap, Hsf y dominio pasajero de Hsf de *N. meningitidis*.

Figura 9.- Un gel teñido con Coomassie que muestra niveles de expresión de Hsf, TbpA y NspA en preparaciones de vesícula de membrana externa obtenidas de diferentes cepas de *N. meningitidis*. Carril 1 - marcadores de peso molecular; carril 2 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en que los polisacáridos capsulares están regulados negativamente; carril 3 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en que los polisacáridos capsulares y PorA estaban regulados negativamente; carril 4 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en que los polisacáridos capsulares y PorA estaban regulados negativamente y NspA estaba regulado positivamente; carril 5 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en que los polisacáridos capsulares y PorA estaban regulados negativamente y Hsf estaba regulado positivamente; carril 6 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en que los polisacáridos capsulares y PorA estaban regulados negativamente y TbpA estaba regulado positivamente; carril 7 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en que los polisacáridos capsulares y PorA estaban regulados negativamente y TbpA y Hsf estaban regulados positivamente; carril 8 - vesículas de membrana externa preparadas a partir de la cepa H44/76 en que los polisacáridos capsulares y PorA estaban regulados negativamente y TbpA y NspA estaban regulados positivamente.

Descripción detallada

La presente invención desvela combinaciones particulares de antígenos de Neisseria que cuando se combinan, conducen a una potenciación sorprendente de la eficacia de la vacuna contra infección por Neisseria. Por consiguiente, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende... [etc. como en la reivindicación 1].

Las infecciones por Neisseria progresan a través de varias fases diferentes. Por ejemplo, el ciclo vital de meningococos implica la colonización nasofaríngea, la adhesión a la mucosa, la penetración al torrente sanguíneo, la multiplicación en la sangre, la inducción de choque tóxico, el cruce de la barrera hematoencefálica y la multiplicación en el fluido cefalorraquídeo y/o las meninges. Diferentes moléculas sobre la superficie de la bacteria estarán implicadas en diferentes etapas del ciclo de infección. Dirigiendo la respuesta inmune contra una cantidad eficaz de una combinación de antígenos particulares, implicados en diferentes procesos de la infección por Neisseria, puede conseguirse una vacuna contra Neisseria con eficacia sorprendentemente elevada.

En particular, combinaciones de ciertos antígenos de diferentes clases, algunas de las cuales están implicadas en la adhesión a células huésped, algunas de las cuales están implicadas en la adquisición de hierro, algunas de las cuales son autotransportadoras y algunas de las cuales son toxinas, pueden provocar una respuesta inmune que proteja contra múltiples fases de infección. Dichas combinaciones de antígenos pueden conducir sorprendentemente a una eficacia de vacuna mejorada (preferiblemente mejorada de forma sinérgica) contra infección por Neisseria donde más de una función de la bacteria está abordada por la respuesta inmune de un modo óptimo.

La eficacia de las vacunas puede evaluarse a través de una diversidad de ensayos. Los ensayos de protección en modelos animales son bien conocidos en la técnica. Además, el ensayo bactericida en suero (ABS) es el marcador inmunológico más habitualmente acordado para estimar la eficacia de la vacuna contra meningococos (Perkins y col. J Infect Dis. 1998, 177:683-691).

Algunas combinaciones de antígenos (por ejemplo, combinaciones de ciertas proteínas autotransportadoras y ciertas proteínas de adquisición de hierro) pueden conducir a protección mejorada en ensayos de modelos animales y/o títulos ABS sinérgicamente superiores. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, dicha combinación sinérgica de antígenos está facilitada por varias características de la respuesta inmune contra la combinación de antígenos. Los propios antígenos están habitualmente expuestos en superficie en las células de Neisseria y tienden a conservarse pero también tienden a no estar presentes en cantidad suficiente sobre la superficie celular para que tenga lugar una respuesta bactericida óptima usando anticuerpos producidos contra el antígeno solo. Combinando los antígenos de la invención puede producirse una formulación que provoque una combinación ventajosa de anticuerpos bactericidas que interaccionan con la célula de Neisseria más allá del umbral crítico. A este nivel crítico, suficientes anticuerpos de suficiente calidad se unen a la superficie de la bacteria para permitir una eliminación eficaz por el complemento y se observan efectos bactericidas muy superiores como consecuencia.

Como los ensayos bactericidas en suero (ABS) reflejan estrechamente la eficacia de las vacunas candidatas, la obtención de buenos títulos ABS por una combinación de antígenos es una buena indicación de la eficacia protectora de una vacuna que contiene esa combinación de antígenos. La invención se refiere al uso de una combinación de dos antígenos aislados o enriquecidos en una mezcla con otros antígenos. Cuando se combinan, dichas combinaciones de antígenos interaccionan de forma ventajosa, y preferentemente de forma sinérgica para provocar una respuesta inmune que es superior en términos de actividad bactericida (por ejemplo, medida por el ensayo bactericida en suero o ABS), y preferentemente superiores que la respuesta aditiva provocada por los antígenos individualmente, más preferentemente por un factor de al menos 1,2, 1,5, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, más preferentemente por un factor de al menos diez.

Una ventaja adicional de la invención es que la combinación de los antígenos de la invención a partir de diferentes familias de proteínas en una composición inmunogénica puede posibilitar la protección contra un intervalo más amplio de cepas.

5 La presente divulgación se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden una pluralidad (dos o más) de proteínas seleccionadas entre al menos dos categorías diferentes de proteínas, que tienen diferentes funciones dentro de Neisseria. Ejemplos de dichas categorías de proteínas son adhesinas, proteínas autotransportadoras, toxinas, proteínas integrales de membrana externa y proteínas de adquisición de Fe. Las combinaciones de vacuna de la invención muestran una mejora sorprendente en la eficacia de vacuna contra cepas homólogas de Neisseria (cepas a partir de las cuales se derivan los antígenos) y preferentemente también contra cepas heterólogas de Neisseria.

En la presente divulgación se desvelan composiciones inmunogénicas que comprenden al menos, o exactamente, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez diferentes antígenos seleccionados entre al menos, o exactamente, dos, tres, cuatro o las cinco categorías de antígenos seleccionadas entre las siguientes:

- al menos una adhesina de Neisseria;
- al menos un autotransportador de Neisseria;
- al menos una toxina de Neisseria;
- al menos una proteína de adquisición de Fe de Neisseria;
- al menos una proteína asociada a membrana de Neisseria (preferentemente proteína de membrana externa, particularmente proteína integral de membrana externa).

20 Se desvelan adicionalmente composiciones inmunogénicas que comprenden al menos, o exactamente, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez diferentes antígenos de Neisseria. Estos antígenos pueden seleccionarse entre al menos, o exactamente, dos, tres, cuatro o cinco grupos de proteínas seleccionadas entre las siguientes:

- al menos una adhesina de Neisseria seleccionada entre el grupo que consiste en FhaB, NspA PilC, Hsf, Hap, MafA, MafB, Omp26, NMB 0315, NMB 0995, NMB 1119 y NadA;
- al menos un autotransportador de Neisseria seleccionado entre el grupo que consiste en Hsf, Hap, IgA proteasa, AspA, y NadA;
- al menos una toxina de Neisseria seleccionada entre el grupo que consiste en VapD, NM-ADPRT y cualquiera o ambas de LPS inmunotipo L2 y LPS inmunotipo L3;
- al menos una proteína de adquisición de Fe de Neisseria seleccionada entre el grupo que consiste en TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB, Lipo28 (GNA2132), Sibp, NMB0964, NMB0293, FbpA, Bcp, BfrA, BfrB y P2086 (XthA); y
- al menos una proteína asociada a membrana de Neisseria, preferentemente proteína de membrana externa, particularmente proteína integral de membrana externa, seleccionada entre el grupo que consiste en PilQ, OMP85, NspA, TbpA, LbpA, TspA, TspB, TdfH, PorB, MltA, HpuB, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA (GNA1946), NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, y P1dA (Omp1A).

Los antígenos de la presente invención están todos aislados, lo que significa que están alterados por la mano del hombre. Preferentemente están purificados en algún grado, más preferentemente son más del 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 ó 99% puros (antes de la combinación con los otros componentes de las composiciones inmunogénicas de la invención).

En una realización desvelada, una composición inmunogénica comprende al menos una adhesina de Neisseria y al menos un autotransportador de Neisseria y opcionalmente una toxina de Neisseria, una proteína de adquisición de Fe de Neisseria o una proteína asociada a membrana de Neisseria (preferentemente proteína integral de membrana externa). Preferentemente, los antígenos se seleccionan entre los antígenos nombrados anteriormente.

45 En una realización desvelada, una composición inmunogénica comprende al menos una adhesina de Neisseria y al menos una toxina de Neisseria y opcionalmente un autotransportador de Neisseria, una proteína de adquisición de Fe de Neisseria o una proteína asociada a membrana de Neisseria (preferentemente proteína integral de membrana externa). Preferentemente, los antígenos se seleccionan entre los antígenos nombrados anteriormente.

50 En una realización desvelada, una composición inmunogénica comprende al menos una adhesina de Neisseria y al menos una proteína de adquisición de Fe de Neisseria y opcionalmente una toxina de Neisseria, o una proteína asociada a membrana de Neisseria (preferentemente proteína integral de membrana externa). Preferentemente, los antígenos se seleccionan entre los antígenos nombrados anteriormente.

55 En una realización desvelada, una composición inmunogénica comprende al menos una adhesina de Neisseria y al menos una proteína asociada a membrana de Neisseria (preferentemente proteína integral de membrana externa) y opcionalmente una toxina de Neisseria, una proteína de adquisición de Fe de Neisseria o un autotransportador de Neisseria. Preferentemente, los antígenos se seleccionan entre los antígenos nombrados anteriormente.

En una realización desvelada, una composición inmunogénica comprende al menos un autotransportador de

Neisseria y al menos una toxina de Neisseria y opcionalmente una adhesina de Neisseria, una proteína de adquisición de Fe de Neisseria o una proteína asociada a membrana de Neisseria (preferentemente proteína integral de membrana externa). Preferentemente, los antígenos se seleccionan entre los antígenos nombrados anteriormente.

5 En una realización desvelada, una composición inmunogénica comprende al menos un autotransportador de Neisseria y al menos una proteína de adquisición de Fe de Neisseria y opcionalmente una adhesina de Neisseria, una toxina de Neisseria o una proteína asociada a membrana de Neisseria (preferentemente proteína integral de membrana externa). Preferentemente, los antígenos se seleccionan entre los antígenos nombrados anteriormente.

10 En una realización desvelada, una composición inmunogénica comprende al menos un autotransportador de Neisseria y al menos una proteína asociada a membrana de Neisseria (preferentemente proteína integral de membrana externa) y opcionalmente una adhesina de Neisseria, una proteína de adquisición de Fe de Neisseria o una toxina de Neisseria. Preferentemente, los antígenos se seleccionan entre los antígenos nombrados anteriormente.

15 En una realización desvelada, una composición inmunogénica comprende al menos una toxina de Neisseria y al menos una proteína de adquisición de Fe de Neisseria y opcionalmente una adhesina de Neisseria, un autotransportador de Neisseria o una proteína asociada a membrana de Neisseria (preferentemente proteína integral de membrana externa). Preferentemente, los antígenos se seleccionan entre los antígenos nombrados anteriormente.

20 En una realización desvelada, una composición inmunogénica comprende al menos una toxina de Neisseria y al menos una proteína asociada a membrana de Neisseria (preferentemente proteína integral de membrana externa) y opcionalmente una adhesina de Neisseria, un autotransportador de Neisseria o una toxina de Neisseria. Preferentemente, los antígenos se seleccionan entre los antígenos nombrados anteriormente.

25 En una realización desvelada, una composición inmunogénica comprende al menos una proteína de adquisición de Fe de Neisseria y al menos una proteína asociada a membrana de Neisseria (preferentemente proteína integral de membrana externa) y opcionalmente una adhesina de Neisseria, un autotransportador de Neisseria o una toxina de Neisseria. Preferentemente, los antígenos se seleccionan entre los antígenos nombrados anteriormente.

Preferentemente, los cinco grupos de antígeno están representados en la composición inmunogénica de la invención.

30 Cuando se menciona específicamente una proteína en el presente documento, es preferentemente una referencia a una proteína nativa de longitud completa, y sus variantes naturales (es decir, a una proteína nativa que se puede obtener de una cepa de Neisseria, preferentemente de meningococos) pero puede también abarcar fragmentos antigénicos de las mismas (particularmente en el contexto de vacunas de subunidad). Estos fragmentos (a menudo descritos específicamente en el presente documento) que contienen o comprenden al menos 10 aminoácidos, preferentemente 20 aminoácidos, más preferentemente 30 aminoácidos, más preferentemente 40 aminoácidos o
 35 mucho más preferentemente 50 aminoácidos, tomados de forma contigua a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Además, fragmentos antigénicos indica fragmentos que son inmunológicamente reactivos con anticuerpos generados contra las proteínas de longitud completa de Neisseria o con anticuerpos generados por infección de un huésped mamífero con Neisseria. Los fragmentos antigénicos también incluyen fragmentos que cuando se administran a una dosis eficaz, provocan una respuesta inmune protectora contra infección por Neisseria,
 40 más preferentemente es protector contra infección por *N. meningitidis* y/o *N. gonorrhoeae*, más preferentemente es protector contra infección por *N. meningitidis* serogrupo B.

También se incluyen en la invención proteínas de fusión recombinantes de proteínas de Neisseria de la invención, o fragmentos de las mismas. Estas pueden combinar diferentes proteínas de Neisseria o fragmentos de las mismas en el mismo polipéptido. Como alternativa, la invención también incluye proteínas de fusión individuales de proteínas de
 45 Neisseria o fragmentos de las mismas, como una proteína de fusión con secuencias heterólogas tales como un proveedor de epítomos de linfocitos T o marcas de purificación, por ejemplo: β -galactosidasa, glutatión-S-transferasa, proteína verde fluorescente (GFP), marcas epitópicas tales como FLAG, marca myc, polihistidina, o proteínas superficiales víricas tales como hemaglutinina del virus de la influenza, toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197.

Antígeno de la invención

50 Referencias NMB se refieren a números de referencia a secuencias a las que puede accederse desde www.neisseria.org.

1. Adhesinas

Las adhesinas incluyen FhaB (documento WO98/02547 NadA (J. Exp.Med (2002) 195:1445; NMB 1994), Hsf también conocido como NhhA (NMB 0992) (documento WO99/31132), Hap (NMB 1985)(documento WO99/55873),
 55 NspA (documento W096/29412), MafA (NMB 0652) y MafB (NMB 0643) (Annu Rev Cell Dev Biol. 16; 423-457 (2000); Nature Biotech 20; 914-921 (2002)), Omp26 (NMB 0181), NMB 0315, NMB 0995, NMB 1119 y PilC (Mol.

Microbiol. 1997, 23; 879-892). Estas son proteínas que están implicadas en la unión de *Neisseria* a la superficie de células huésped. Hsf es un ejemplo de una adhesina, así como de una proteína autotransportadora. Las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento por lo tanto pueden incluir combinaciones de Hsf y otras proteínas autotransportadoras en las que Hsf contribuye en su capacidad como adhesina. Estas adhesinas pueden obtenerse de *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae* u otras cepas de *Neisseria*. La invención también puede incluir otras adhesinas de *Neisseria*.

FhaB

Este antígeno se ha descrito en el documento WO98/02547 SEC ID N° 38 (nucleótidos 3083-9025) - véase también NMB0497. Los presentes inventores han descubierto que FhaB es particularmente eficaz en la inducción de anticuerpos anti-adhesivos solos y en particular con otros antígenos de la invención. Aunque podría usarse FhaB de longitud completa, los inventores han descubierto que truncamientos C-terminales particulares son sorprendentemente al menos tan eficaces y preferentemente incluso más eficaces en términos de efecto de cepa cruzada. Dichos truncamientos también han demostrado ser ventajosamente mucho más fáciles de clonar. Los truncamientos de FhaB de la invención típicamente corresponden a dos tercios N-terminales de la molécula FhaB, preferentemente estando situado el nuevo extremo C-terminal en la posición 1200-1600, más preferentemente en la posición 1300-1500, y mucho más preferentemente en la posición 1430-1440. Realizaciones específicas tienen el extremo C-terminal en 1433 ó 1436. Dichos truncamientos FhaB pueden ser componentes de las composiciones inmunogénicas de combinación de la invención. El extremo N-terminal también puede estar truncado en hasta 10, 20, 30, 40 ó 50 aminoácidos.

2. Proteínas autotransportadoras

Las proteínas autotransportadoras típicamente están compuestas por una secuencia señal, un dominio pasajero y un dominio de anclaje para la adhesión a la membrana externa. Ejemplos de proteínas autotransportadoras incluyen Hsf (documento WO99/31132) (NMB 0992), HMW, Hia (van Ulsen y col Immunol. Med. Microbiol. 2001 32; 53-64), Hap (NMB 1985) (documento WO99/55873; van Ulsen y col Immunol. Med. Microbiol. 2001 32; 53-64), UspA, UspA2, NadA (NMB 1994) (Comanducci y col J. Exp. Med. 2002 195; 1445-1454), AspA (Infection and Immunity 2002,70(8); 4447-4461; NMB 1029), proteína tipo Aida-1, SSh-2 y Tsh. NadA (J. Exp. Med (2002) 195:1445) es otro ejemplo de una proteína autotransportadora, así como de una adhesina. Composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento pueden por lo tanto incluir combinaciones de NadA y adhesinas en que NadA contribuye en su capacidad como proteína autotransportadora. Estas proteínas pueden obtenerse de *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae* u otras cepas de *Neisseria*. La invención también puede incluir otras proteínas autotransportadoras de *Neisseria*.

Hsf

Hsf tiene una estructura que es común a las proteínas autotransportadoras. Por ejemplo, Hsf de *N. meningitidis* cepa H44/76 consta de una secuencia señal compuesta por los aminoácidos 1-51, una región de cabeza en el extremo N-terminal de la proteína madura (aminoácidos 52-479) que está expuesta en superficie y contiene las regiones variables (aminoácidos 52-106, 121-124, 191-210 y 230-234), una región de cuello (aminoácidos 480-509), una región de hélice alfa hidrófoba (aminoácidos 518-529) y un dominio de anclaje en el que cuatro cadenas transmembrana abarcan la membrana externa (aminoácidos 539-591).

Aunque puede usarse Hsf de longitud completa en composiciones inmunogénicas de la invención, también pueden usarse ventajosamente diversos truncamientos y deleciones de Hsf dependiendo del tipo de vacuna.

Quando se usa Hsf en una vacuna se subunidad, se prefiere usar una parte del dominio pasajero soluble; por ejemplo el dominio completo de los aminoácidos 52 a 479, más preferentemente una parte conservada del mismo, por ejemplo la secuencia particularmente ventajosa de aminoácidos 134 a 479. Formas preferidas de hsf pueden truncarse para deleccionar regiones variables de la proteína desvelada en el documento WO01/55182. Variantes preferidas incluirían la deleción de una, dos, tres, cuatro o cinco regiones variables definidas en el documento WO01/55182. Las secuencias anteriores y las descritas a continuación, pueden extenderse o truncarse en hasta 1, 3, 5, 7, 10 ó 15 aminoácidos en el extremo N o C o ambos.

Fragmentos preferidos de Hsf por lo tanto incluyen la región de cabeza completa de Hsf, preferentemente conteniendo los aminoácidos 52-473. Fragmentos preferidos adicionales de Hsf incluyen regiones expuestas en superficie de la cabeza incluyendo una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos; 52-62, 76-93, 116-134, 147-157, 157-175, 199-211, 230-252, 252-270, 284-306, 328-338, 362-391, 408-418, 430-440 y 469-479.

Quando Hsf está presente en una preparación de vesícula de membrana externa, puede expresarse como proteína de longitud completa o preferentemente como una variante ventajosa compuesta de una fusión de los aminoácidos 1-51 y 134-591 (produciendo una proteína de membrana externa madura de la secuencia de aminoácidos 134 al extremo C-terminal). Formas preferidas de Hsf pueden truncarse para deleccionar regiones variables de la proteína desvelada en el documento WO01/55182. Variantes preferidas incluirían la deleción de una, dos, tres, cuatro o cinco regiones variables definidas en el documento WO01/55182. Preferentemente, la primera y segunda regiones variables se deleccionan. Variantes preferidas deleccionarían restos entre la secuencia de aminoácidos 2 a 237 ó 54 a

237, más preferentemente delecionando restos entre el aminoácido 52 a 133 ó 55 a 133. La proteína madura carecería del péptido señal.

Hap

- 5 El análisis por ordenador de la proteína tipo Hap de *Neisseria meningitidis* revela al menos tres dominios estructurales. Considerando la secuencia tipo Hap de la cepa H44/76 como referencia, el Dominio 1, que comprende los aminoácidos 1 a 42, codifica un péptido señal dependiente de sec característico de la familia de autotransportadores, el Dominio 2, que comprende los aminoácidos 43 a 950, codifica el dominio pasajero probablemente expuesto en superficie y accesible al sistema inmune, el Dominio 3, que comprende los restos 951 al extremo C-terminal (1457), se predice que codifica cadenas beta probablemente para ensamblarse en una estructura tipo barril y para anclarse en la membrana externa. Como el dominio 2 está probablemente expuesto en superficie, está bien conservado (más del 80% en todas las cepas ensayadas) y podría producirse como antígenos de subunidad en *E. coli*, representa un candidato de vacuna interesante. Como los dominios 2 y 3 probablemente están expuestos en superficie, están bien conservados (Pizza y col. (2000), Science 287: 1816-1820), representan candidatos de vacuna interesantes. El dominio 2 se conoce como dominio pasajero.
- 10
- 15 Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender la proteína Hap de longitud completa, preferentemente incorporada en una preparación de VME. Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden comprender el dominio pasajero de Hap que en la cepa H44/76 está compuesto de los restos de aminoácidos 43-950. Este fragmento de Hap se usaría de forma particularmente ventajosa en una composición de subunidad de la invención. La secuencia anterior para el dominio pasajero de Hap puede extenderse o truncarse en hasta 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 ó 30 aminoácidos en el extremo N o C o ambos.
- 20

3. Proteínas de adquisición de hierro

- Las proteínas de adquisición de hierro incluyen TbpA (NMB 0461) (documentos WO92/03467, US5912336, WO93/06861 y EP586266), TbpB (NMB 0460) (documentos WO93/06861 y EP586266), LbpA (NMB 1540) (Med Microbiol (1999) 32:1117), LbpB (NMB 1541) (documento WO/99/09176), HpuA (U73112.2) (Mol Microbiol. 1997, 23; 737-749), HpuB (NC_003116.1) (Mol Microbiol. 1997, 23;737-749), P2086 (13^{er} International Pathogenic Neisseria Conference 2002), FbpA (NMB 0634), FbpB, BfrA (NMB 1207), BfrB (NMB 1206), Lipo28 también conocida como GNA2132 (NMB 2132), Sibp (NMB 1882), HmbR, HemH, Bcp (NMB 0750), proteína transportadora-permeasa ABC de hierro (III) (Tettelin y col Science 287; 1809-1815 2000), transportador-periplásmico ABC de hierro (III) (Tettelin y col Science 287; 1809-1815 2000), receptor dependiente de TonB (NMB 0964 y NMB 0293) (Tettelin y col Science 287; 1809-1815 2000) y proteína relacionada con la proteína de unión a transferrina (Tettelin y col Science 287; 1809-1815 2000). Estas proteínas pueden obtenerse de *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae* u otras cepas de *Neisseria*. La invención también puede incluir otras proteínas de adquisición de hierro de *Neisseria*.
- 25
- 30

TbpA

- TbpA interacciona con TbpB para formar un complejo proteico en la membrana externa de *Neisseria*, que se une a transferrina. Estructuralmente, TbpA contiene un dominio N-terminal intracelular con una caja TonB y dominio conector, múltiples cadenas beta transmembrana unidas por cortos bucles intracelulares y extracelulares más largos.
- 35

- Se han distinguido dos familias de TbpB, que tienen un elevado peso molecular y un bajo peso molecular respectivamente. Las formas de alto y bajo peso molecular de TbpB se asocian con diferentes familias de TbpA que son distinguibles en base a la homología. A pesar de ser de similar peso molecular, se conocen como las familias de alto peso molecular y bajo peso molecular a causa de su asociación con la forma de alto o bajo peso molecular de TbpB (Rokbi y col FEMS Microbiol. Lett. 100; 51, 1993). Las expresiones TbpA (alto) y TbpA (bajo) se usan para hacer referencia a estas dos formas de TbpA, y de forma similar para TbpB. Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender TbpA y TbpB de los serogrupos A, B, C, Y y W-135 de *N. meningitidis* así como proteínas de adquisición de hierro de otras bacterias incluyendo *N. gonorrhoeae*. Las proteínas de unión a transferrina TbpA y TbpB también se han mencionado como Tbp1 y Tbp2 respectivamente (Cornelissen y col Infection and Immunity 65; 822, 1997).
- 40
- 45

- TbpA contiene varias regiones distintas. Por ejemplo, en el caso de TbpA de *N. meningitidis* cepa H44/76, los 186 aminoácidos amino terminales forman un dominio globular interno, 22 cadenas beta abarcan la membrana, formando una estructura de barril beta. Éstas están unidas por cortos bucles intracelulares y bucles extracelulares más largos. Los bucles extracelulares 2, 3 y 5 tienen el mayor grado de variabilidad de secuencia y el bucle 5 está expuesto en superficie. Los bucles 5 y 4 están implicados en la unión a ligando.
- 50

- Los fragmentos preferidos de TbpA incluyen los bucles extracelulares de TbpA. Usando la secuencia de TbpA de *N. meningitidis* cepa H44/76, estos bucles corresponden a los aminoácidos 200-202 para el bucle 1, los aminoácidos 226-303 para el bucle 2, los aminoácidos 348-395 para el bucle 3, los aminoácidos 438-471 para el bucle 4, los aminoácidos 512-576 para el bucle 5, los aminoácidos 609-625 para el bucle 6, los aminoácidos 661-671 para el bucle 7, los aminoácidos 707-723 para el bucle 8, los aminoácidos 769-790 para el bucle 9, los aminoácidos 814-844 para el bucle 10 y los aminoácidos 872-903 para el bucle 11. Las secuencias correspondientes, después de la
- 55

alineación de secuencia, en otras proteínas Tbp también constituirían fragmentos preferidos. Los fragmentos más preferidos incluirían secuencias de aminoácidos que constituyen el bucle 2, bucle 3, bucle 4 o bucle 5 de Tbp.

5 Cuando las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden TbpA, es preferible que incluyan tanto TbpA (alto) y TbpA (bajo). Aunque TbpA se presente preferentemente en una vacuna de VME, también puede ser parte de una vacuna de subunidad. Por ejemplo, las proteínas de adquisición de hierro aisladas que podrían introducirse en una composición inmunogénica de la invención son bien conocidas en la técnica (documento WO00/25811). Pueden expresarse en un huésped bacteriano, extraerse usando detergente (por ejemplo Elugent al 2%) y purificarse por cromatografía de afinidad o usando técnicas cromatográficas en columna convencional bien conocidas en la técnica (Oakhill y col Biochem J. 2002 364; 613-6).

10 Cuando TbpA se presenta en una vacuna de VME, su expresión puede regularse positivamente por técnicas genéticas analizadas en el presente documento, o preferentemente puede regularse positivamente por cultivo de la cepa precursora en condiciones limitantes de hierro como se describe a continuación. Este procedimiento también provocaría la regulación positiva de proteínas reguladas por hierro variable, particularmente FrpB que puede llegar a ser inmunodominante y por lo tanto es ventajoso regular negativamente la expresión de (y preferentemente

15 deletar los genes que codifican) dichas proteínas (particularmente FrpB) como se describe a continuación, para asegurar que la composición inmunogénica de la invención provoca una respuesta inmune contra antígenos presentes en un amplio intervalo de cepas de *Neisseria*. Se prefiere tener tanto TbpA (alto) y TbpA (bajo) presentes en la composición inmunogénica y esto se consigue preferentemente combinando VME derivadas de dos cepas, que expresan las formas alternativas de TbpA.

20 4. Toxinas

Las toxinas incluyen NM-ADPRT (NMB 1343) (13th International Pathogenic *Neisseria* Conference 2002 Masignani y col p135), VapD (NMB 1753), lipopolisacárido (LPS; también llamado lipooligosacárido o LOS) inmunotipo L2 y LPS inmunotipo L3. FrpA y FrpC contienen una región que está conservada entre estas dos proteínas y un fragmento preferido de las proteínas sería un polipéptido que contiene este fragmento conservado, preferentemente

25 comprendiendo los aminoácidos 227-1004 de la secuencia de FrpA/C. Estos antígenos pueden obtenerse de *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae* u otras cepas de *Neisseria*. La invención también puede incluir otras toxinas de *Neisseria*.

En una realización desvelada alternativa, las toxinas pueden incluir antígenos implicados en la regulación de la toxicidad, por ejemplo OstA que funciona en la síntesis de lipopolisacáridos.

30 LPS

LPS (lipopolisacárido, también conocido como LOS-lipooligosacárido) es la endotoxina sobre la membrana externa de *Neisseria*. El resto polisacárido del LPS se sabe que induce anticuerpos bactericidas.

La heterogeneidad dentro del resto oligosacárido del LPS genera diversidad estructural y antigénica entre diferentes cepas de *Neisseria* (Griffiss y col. Inf. Immun. 1987; 55: 1792-1800). Esto se ha usado para subdividir las cepas de meningococos en 12 inmunotipos (Scholtan y col. J Med Microbiol 1994, 41:236-243). Los inmunotipos L3, L7 y L9 son inmunológicamente idénticos y son estructuralmente similares (o incluso iguales) y por lo tanto se han denominado L3,7,9 (o, para los fines de esta memoria descriptiva, genéricamente como "L3"). El LPS de meningococos L3,7,9 (L3), L2 y L5 pueden modificarse por sialilación, o por la adición de ácido citidina 5'-monofosfato-ácido N-acetilneuramínico. Aunque LPS L2, L4 y L6 son distinguibles inmunológicamente, son

35 estructuralmente similares y cuando se menciona L2 en el presente documento, L4 o L6 pueden sustituirse opcionalmente dentro del alcance de la invención. Véase M. P. Jennings y col, Microbiology 1999, 145, 3013-3021 y Mol Microbiol 2002, 43:931-43 para ilustración adicional de la estructura y heterogeneidad de LPS.

El LPS, preferentemente LPS de meningococos, incluido en las vacunas de la invención es de inmunotipos L3 y se presenta en una vesícula de membrana externa (preferentemente cuando la vesícula se extrae con un detergente de bajo porcentaje, más preferentemente del 0-0,5%, 0,02-0,4%, 0,04-0,3%, 0,06-0,2%, 0,08-0,15% ó 0,1%, más preferentemente desoxicolato [DOC]) pero también puede ser parte de una vacuna de subunidad. El LPS puede aislarse usando un procedimiento bien conocido que incluye el procedimiento de agua caliente-fenol (Wesphal y Jann Meth. Carbo. Chem. 5; 83-91 1965). Véase también Galanos y col. 1969, Eur J Biochem 9: 245-249, y Wu y col. 1987, Anal Bio Chem 160:281-289. El LPS puede usarse sencillo o conjugado con una fuente de epítomos de linfocitos T tal como toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM-197 o proteínas de membrana externa de VME. Las técnicas para conjugar LOS aislados son también conocidas (véase por ejemplo el documento EP 941738 incorporado por referencia en el presente documento).

45

50

Cuando LOS (en particular el LOS de la invención) está presente en una formulación de ampolla el LOS se conjuga preferentemente in situ por procedimientos que permiten la conjugación de LOS con una o más proteínas de membrana externa también presentes en la preparación de ampolla (por ejemplo, PorA o PorB en meningococos).

55

Este procedimiento puede potenciar ventajosamente la estabilidad y/o inmunogeneidad (proporcionando ayuda a linfocitos T) y/o antigeneidad del antígeno LOS dentro de la formulación de ampolla - dando de este modo la ayuda a linfocitos T para el inmunógeno oligosacárido independiente de T en su conformación más protectora - como LOS en su entorno natural sobre la superficie de membrana externa de meningococos. Además, la conjugación del LOS dentro de la ampolla puede provocar la destoxicación del LOS (la parte de lípido A estando establemente enterrada en la membrana externa estando de este modo menos disponible para causar toxicidad). Por tanto los procedimientos de destoxicación mencionados en el presente documento para aislar ampollas de mutantes htrB⁻ o msbB⁻, o añadiendo un equivalente funcional peptídico no tóxico de polimixina B [una molécula con alta afinidad por lípido A] a la composición (véase el documento WO 93/14115, documento WO 95/03327, Velucchi y col (1997) J Endotoxin Res 4: 1-12, y documento EP 976402 para detalles adicionales de equivalentes funcionales peptídicos no tóxicos de polimixina B - particularmente el uso del péptido SAEP 2 (de secuencia KTKCKFLKKC en que las 2 cisteínas forman un puente disulfuro)) puede no ser necesario (pero los cuales pueden añadirse en combinación para seguridad adicional). Por tanto los inventores han descubierto que una composición que comprende ampollas en las que el LOS presente en las ampollas se ha conjugado de un modo intra-ampolla con proteínas de membrana externa también presentes en la ampolla puede formar la base de una vacuna para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por el organismo a partir del cual se ha obtenido las ampollas, en que dicha vacuna es sustancialmente no tóxica y es capaz de inducir una respuesta bactericida T-dependiente contra LOS en su entorno nativo.

Esta divulgación, por lo tanto, proporciona adicionalmente dicha preparación de una ampolla de meningococos conjugada con LOS intra-ampolla.

Dichas preparaciones de ampolla pueden aislarse de las bacterias en cuestión (véase el documento WO 01/09350), y después someterse a químicas de conjugación conocidas para unir grupos (por ejemplo, NH₂ o COOH) en la parte oligosacárido de LOS a grupos (por ejemplo, NH₂ o COOH) en las proteínas de membrana externa de la ampolla. Pueden usarse técnicas de reticulación usando un glutaraldehído, formaldehído, o mezclas de glutaraldehído/formaldehído, pero se prefiere usar químicas más selectivas tales como EDAC o EDAC/NHS (J.V. Staros, R.W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220-222 (1986); y Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pág. 173-176). Otras químicas de conjugación o tratamientos capaces de crear enlaces covalentes entre LOS y moléculas proteicas que podrían usarse se describen en el documento EP 941738.

Preferentemente, las preparaciones de ampolla se conjugan en ausencia de polisacárido capsular. Las ampollas pueden aislarse de una cepa que no produce polisacárido capsular (de forma natural o por mutación como se describe a continuación), o pueden purificarse de la mayoría y preferentemente todo el polisacárido capsular contaminante. De este modo, la reacción de conjugación del LOS intra-ampolla es mucho más eficaz.

Preferentemente, más del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ó el 95% del LOS presente en las ampollas está reticulado/conjugado.

La conjugación intra-ampolla debe incorporar preferentemente 1, 2 o las 3 siguientes etapas del procedimiento: el pH de conjugación debe ser mayor de pH 7,0, preferentemente mayor de o igual a pH 7,5 (más preferentemente por debajo de pH 9); las condiciones del 1-5% preferentemente 2-4% más preferentemente aproximadamente 3% de sacarosa deben mantenerse durante la reacción; el NaCl debe minimizarse en la reacción de conjugación, preferentemente por debajo 0,1 M, 0,05 M, 0,01 M, 0,005 M, 0,001 M, y más preferentemente no estar presente en absoluto. Todos estas características del procedimiento aseguran que las ampollas permanezcan estables y en solución durante todo el procedimiento de conjugación.

El procedimiento de conjugación con EDAC/NHS es un procedimiento preferido para la conjugación intra-ampolla. El EDAC/NHS se prefiere a formaldehído que puede reticular a un grado demasiado elevado afectando de forma adversa a la capacidad de filtración. El EDAC reacciona con ácidos carboxílicos (tales como KDO en LOS) para crear un intermedio éster activo. En presencia de un nucleófilo amina (tal como lisinas en proteína de membrana externa tales como PorB), se forma un enlace amida con liberación de un subproducto isourea. Sin embargo, la eficacia de una reacción mediada por EDAC puede aumentarse a través de la formación de un intermedio éster sulfo-NHS. El éster sulfo-NHS sobrevive en solución acuosa más que el éster activo formado a partir de la reacción de EDAC solo con un carboxilato. Por tanto, pueden conseguirse rendimientos mayores de formación de enlace amida usando este procedimiento de dos fases. La conjugación con EDAC/NHS se analiza en J.V. Staros, R.W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220-222 (1986); y Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pág. 173-176. Preferentemente, se usan 0,01-5 mg de EDAC /mg de ampolla en la reacción, más preferentemente 0,05-1 mg de EDAC/ mg de ampolla. La cantidad de EDAC usada depende de la cantidad de LOS presente en la muestra que a su vez depende del porcentaje de desoxicolato (DOC) usado para extraer las ampollas. A un bajo porcentaje de DOC (por ejemplo, 0,1%), se usan elevadas cantidades de EDAC (1 mg/mg y más allá), sin embargo a porcentajes de DOC mayores (por ejemplo, 0,5%), se usan cantidades inferiores de EDAC (0,025-0,1 mg/mg) para evitar demasiada reticulación intra-ampolla.

- Un procedimiento de la presente divulgación es, por lo tanto, un procedimiento para producir LOS conjugado intra-ampolla (preferentemente de meningococos) que comprende las etapas de conjugar ampollas en presencia de EDAC/NHS a un pH entre pH 7,0 y pH 9,0 (preferentemente de aproximadamente pH 7,5), en 1-5% (preferentemente de aproximadamente el 3%) de sacarosa, y opcionalmente en condiciones sustancialmente desprovistas de NaCl (como se ha descrito anteriormente), y aislar las ampollas conjugadas de la mezcla de reacción.
- La reacción puede seguirse en geles de separación de Western de la mezcla de reacción usando mAbs anti-LOS (por ejemplo, anti-L2 o anti-L3) para mostrar el aumento de peso molecular de LOS para una mayor proporción del LOS en las ampollas según avanza el tiempo de reacción.
- Pueden recuperarse rendimientos del 99% de ampollas usando dichas técnicas.
- Se encontró que EDAC es un excelente agente reticulante intra-ampolla ya que reticulaba LOS con PME suficientemente para una inmunogenicidad T-dependiente de LOS mejorada, pero no lo reticulaba a un grado tan elevado que diera problemas tales como mala capacidad de filtración, agregación y reticulación inter-ampolla. La morfología de las ampollas generadas es similar a la de ampollas no conjugadas (por microscopia electrónica). Además, el protocolo anterior evitaba que tuviera lugar una reticulación demasiado elevada (que puede disminuir la inmunogenicidad de las PME protectoras presentes de forma natural sobre la superficie de la ampolla, por ejemplo, TbpA o Hsf).
- Se prefiere que la cepa de meningococos de la cual se derivan las ampollas sea una cepa mutante que no pueda producir polisacárido capsular (por ejemplo, una de las cepas mutantes descritas a continuación, en particular siaD⁻). También se prefiere que las composiciones inmunogénicas eficaces contra enfermedad por meningococos comprendan tanto una ampolla L2 como L3, en que LOS L2 y L3 están ambos conjugados a proteína de membrana externa de la ampolla. Además, se prefiere que la estructura del LOS dentro de la ampolla conjugado intra-ampolla sea covalente con la que se obtiene de una cepa de meningococos IgtB⁻ (como se describe a continuación). Más preferentemente, las composiciones inmunogénicas comprenden ampollas conjugadas intra-ampolla: derivadas de una cepa de meningococos mutantes que no puede producir polisacárido capsular IgtB⁻; que comprende ampollas L2 y L3 derivadas de cepas de meningococos mutantes que no pueden producir polisacárido capsular; que comprende ampollas L2 y L3 derivadas de cepas de meningococos mutantes que son IgtB⁻; o más preferentemente que comprenden ampollas L2 y L3 derivadas de cepas de meningococos mutantes que no pueden producir polisacárido capsular y son IgtB⁻.
- Una cepa de meningococos L3 típica que puede usarse para la presente invención es la cepa H44/76 menB. Una cepa L2 típica es la cepa B16B6 menB o la cepa de meningococos tipo C 39E.
- Como se ha indicado anteriormente, las ampollas de la invención pueden destoxificarse a un grado por la acción de conjugación, y por lo tanto puede no ser necesario destoxificarlas adicionalmente, sin embargo, pueden usarse procedimientos de destoxificación adicionales para seguridad adicional, por ejemplo usando ampollas derivadas de una cepa de meningococos que es htrB⁻ o msbB⁻ o añadiendo un equivalente funcional peptídico no tóxico de polimixina B [una molécula con alta afinidad por lípido A] (preferentemente SEAP 2) a la composición de ampolla (como se ha descrito anteriormente).
- De este modo se desvelan ampollas de meningococos y composiciones inmunogénicas que comprenden ampollas que tienen un importante LOS antigénico que es sustancialmente no tóxico, desprovisto de problemas de autoinmunidad, que tiene un carácter T-dependiente, está presente en su entorno natural, y es capaz de inducir una respuesta de anticuerpo bactericida contra más del 90% de las cepas de meningococos (en el caso de composiciones L2+L3).
- Preferentemente, la conjugación LOS intra-ampolla debe incorporar 1, 2 o las 3 siguientes etapas de procedimiento: el pH de conjugación debe ser mayor de pH 7,0, preferentemente mayor de o igual a pH 7,5 (más preferentemente por debajo de pH 9); las condiciones del 1-5% preferentemente el 2-4% más preferentemente aproximadamente el 3% de sacarosa deben mantenerse durante la reacción; el NaCl debe minimizarse en la reacción de conjugación, preferentemente por debajo del 0,1 M, 0,05 M, 0,01 M, 0,005 M, 0,001 M, y más preferentemente no debe estar presente en absoluto. Todas estas características de procedimiento aseguran que las ampollas permanezcan estables y en solución durante todo el procedimiento de conjugación.
- Aunque el LOS puede conjugarse dentro de ampollas a proteínas de membrana externa por diversas técnicas y químicas, el procedimiento de conjugación con EDAC/NHS es un procedimiento preferido para conjugación intra-ampolla. Se prefiere EDAC/NHS a formaldehído que puede reticular a un grado demasiado elevado afectando de forma adversa a la capacidad de filtración. El EDAC reacciona con ácidos carboxílicos para crear un intermedio éster activo. En presencia de un nucleófilo amina, se forma un enlace amida con liberación de un subproducto isourea. Sin embargo, puede aumentarse la eficacia en la reacción mediada por EDAC a través de la formación de un intermedio éster sulfo-NHS. El éster sulfo-NHS sobrevive en solución acuosa más tiempo que el éster formado a partir de la reacción de EDAC solo con un carboxilato. Por tanto, pueden conseguirse rendimientos más elevados de formación de enlace amida usando este procedimiento de dos fases. La conjugación con EDAC/NHS se analiza en J.V. Staros,

R.W. Wright y D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Analytical chemistry* 156: 220-222 (1986); y *Bioconjugates Techniques*. Greg T. Hermanson (1996) pág. 173-176.

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

10 La reacción puede seguirse en geles de separación de la mezcla de reacción usando mAbs anti-LOS (por ejemplo, anti-L2 o anti-L3) para mostrar el aumento de peso molecular de LOS para una mayor proporción del LOS en las ampollas según avanza el tiempo de reacción.

15 Pueden recuperarse rendimientos del 99% de ampollas usando dichas técnicas. Se descubrió que EDAC era un excelente agente reticulante intra-ampolla ya que reticulaba LOS con PME suficientemente para una inmunogeneidad T-dependiente de LOS mejorada, pero no reticulaba a un grado tan elevado que diera problemas tales como mala capacidad de filtración, y reticulación inter-ampolla. También debe evitarse una reticulación demasiado elevada para evitar cualquier disminución en la inmunogeneidad de las PME protectoras presentes de forma natural en la superficie de la ampolla, por ejemplo, TbpA.

5. *Proteínas integrales de membrana externa*

20 Otras categorías de proteínas de *Neisseria* también pueden ser candidatas para la inclusión en las vacunas contra *Neisseria* de la invención y pueden ser capaces de combinarse con otros antígenos de un modo sorprendentemente eficaz. Las proteínas asociadas a membrana, particularmente proteínas integrales de membrana y más ventajosamente proteínas de membrana externa, especialmente proteínas integrales de membrana externa pueden usarse en las composiciones de la presente invención. Un ejemplo de dicha proteína es PldA también conocida como Omp1A (NMB 0464). (Documento WO00/15801) que es una proteína de membrana externa fosfolipasa de *Neisseria*. Ejemplos adicionales son TspA (NMB 0341) (*Infect. Immun.* 1999, 67; 3533-3541) y TspB (proteína estimuladora de linfocitos T) (Documento WO 00/03003; NMB 1548, NMB 1628 o NMB 1747). Ejemplos adicionales incluyen PiiQ (NMB 1812) (Documento WO99/61620), OMP85 - también conocida como D15- (NMB 0182) (Documento WO00/23593), NspA (U52066) (Documento WO96/29412), PorB (NMB 2039) (*Mol. Biol. Evol.* 12; 363-370, 1995), HpuB (NC_003116.1), TdfH (NMB 1497) (*Microbiology* 2001, 147; 1277-1290), OstA (NMB 0280), MitA también conocida como GNA33 y Lipo30 (NMB0033), HtrA (NMB 0532; documento WO 99/55872), HimD (NMB 1302), HisD (NMB 1581), GNA 1870 (NMB 1870), HlpA (NMB 1946), NMB 1124, NMB 1162, NMB 1220, NMB 1313, NMB 1953, HtrA, TbpA (NMB 0461) (Documento WO92/03467 (véase también anteriormente en proteínas de adquisición de hierro) y LbpA (NMB 1541).

OMP85

35 Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender OMP85 de longitud completa, preferentemente como parte de una preparación de VME. También pueden usarse fragmentos de OMP85 en composiciones inmunogénicas de la invención, en particular, el dominio expuesto en superficie de OMP85 compuesto de los restos de aminoácidos 1-475 ó 50-475 se incorporan preferentemente en un componente de subunidad de las composiciones inmunogénicas de la invención. La secuencia anterior para el dominio expuesto en superficie de OMP85 puede extenderse o truncarse en hasta 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 ó 30 aminoácidos en el extremo N o C o ambos. Se prefiere omitir la secuencia señal del fragmento OMP85.

OstA

45 OstA funciona en la síntesis de lipopolisacáridos y puede considerarse un regulador de la toxicidad. OstA puede incluirse alternativamente en la categoría de toxinas en que la categoría de toxinas está ampliada para contener reguladores de toxicidad así como toxinas.

Composiciones inmunogénicas

50 Una composición inmunogénica es una composición que comprende al menos un antígeno que es capaz de generar una respuesta inmune cuando se administra a un huésped. Preferentemente, dichas preparaciones inmunogénicas son capaces de generar una respuesta inmune protectora contra infección por *Neisseria*, preferentemente *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae*.

La invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden al menos dos antígenos, que preferentemente provocan una o más respuestas bactericidas, protectoras, o de bloqueo de la adhesión sinérgicas.

Ensayos bactericidas ABS de la invención

Dicha respuesta sinérgica puede caracterizarse por la ABS provocada por la combinación de antígenos que es al menos un 50%, dos veces, tres veces, preferentemente cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces y más preferentemente diez veces superior que la ABS provocada por cada antígeno por separado. Preferentemente la ABS se mide contra una cepa homóloga a partir de la cual se derivan los antígenos y preferentemente también contra un panel de cepas heterólogas. (Véase a continuación para un panel representativo por ejemplo BZ10 (B:2b:P1.2) que pertenece al grupo A-4; B16B6 (B:2a:P1.2) que pertenece al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1.7,16)). ABS es el marcador inmunológico más comúnmente acordado para estimar la eficacia de una vacuna contra meningococos (Perkins y col. J Infect Dis. 1998, 177:683-691). Una ABS satisfactoria puede determinarse por cualquier procedimiento conocido. La ABS puede realizarse usando sueros obtenidos de modelos animales (véanse los ejemplos 17-20), o de sujetos humanos.

Un procedimiento preferido para realizar ABS con sueros humanos es el siguiente. Se toma una muestra de sangre antes de la primera vacunación, dos meses después de la segunda vacunación y un mes después de la tercera vacunación (siendo tres vacunaciones en un año un programa de vacunación principal humano típico en, por ejemplo, 0, 2 y 4 meses, o 0, 1 y 6 meses). Dichos programas de vacunación primaria humana pueden realizarse en bebés de menos de 1 año de edad (por ejemplo, al mismo tiempo que se realizan las vacunaciones Hib) o de 2-4 años de edad o adolescentes también pueden vacunarse para ensayar la ABS con dicho programa de vacunación primaria. Puede tomarse una muestra de sangre adicional de 6 a 12 meses después de la vacunación primaria y un mes después de una dosis de refuerzo, si fuera aplicable.

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

Por supuesto, una preparación de antígeno o ampolla con actividad bactericida heteróloga también puede constituir una preparación de ampolla con actividad bactericida homóloga si también puede provocar ABS satisfactoria contra la cepa de meningococos de la cual se obtiene.

La ABS será satisfactoria para una preparación de antígeno o ampolla con actividad bactericida heteróloga si un mes después de la tercera dosis de vacuna (del programa de vacunación primaria) (en niños de 2-4 años de edad o adolescentes, pero preferentemente en bebés en el primer año de vida) el porcentaje de sujetos para un aumento de factor cuatro en términos de título ABS (dilución de anticuerpo) (en comparación con el título pre-vacunación) contra tres cepas heterólogas de meningococos es mayor del 20%, preferentemente mayor del 30%, más preferentemente mayor del 35%, y mucho más preferentemente mayor del 40% de los sujetos. Dicho ensayo es una buena indicación de si la preparación de antígeno o ampolla con actividad bactericida heteróloga puede inducir anticuerpos bactericidas cruzados contra diversas cepas de meningococos. Las tres cepas heterólogas deben tener preferentemente diferente complejo de tipo electroforético (ET) o patrón del tipo de secuencia multi-locus (MLST) (véase Maiden y col. PNAS USA 1998, 95:3140-5) entre sí y preferentemente con la cepa de la cual se prepara u obtiene la preparación de antígeno o ampolla con actividad bactericida heteróloga. Un especialista en la técnica será fácilmente capaz de determinar tres cepas con diferente complejo ET que reflejen la diversidad genética observada entre meningococos, particularmente entre cepas de meningococos tipo B que están reconocidas como la causa de cargas significativas de enfermedad y/o que representan linajes hipervirulentos MenB reconocidos (véase Maiden y col. *Supra*). Por ejemplo, tres cepas que podrían usarse son las siguientes: BZ10 (B:2b:P1.2) que pertenece al grupo A-4; B16B6 (B:2a:P1.2) que pertenece al complejo ET-37; y H44/76 (B:15:P1.7,16) que pertenece al complejo ET-5, o cualquier otra cepa que pertenezca al mismo ET/Grupo. Dichas cepas pueden usarse para ensayar una preparación de antígeno o ampolla con actividad bactericida heteróloga preparada u obtenida de, por ejemplo, la cepa de meningococos CU385 (B:4:P1.15) que pertenece al complejo ET-5. Otra cepa de muestra que podría usarse es del clon epidémico de linaje 3 (por ejemplo, NZ124[B:4:P1.7,4]). Otra cepa ET-37 es NGP165 (B:2a:P1.2).

Los procedimientos para medir la actividad ABS son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento que podría usarse se describe en el documento WO 99/09176 en el Ejemplo 10C. En términos generales, se cultiva un cultivo de la cepa a ensayar (preferentemente en condiciones de agotamiento de hierro - por adición de un quelante de hierro tal como EDDA al medio de cultivo) en fase logarítmica de cultivo. Este puede suspenderse en un medio con BSA (tal como un medio de Hanks con BSA al 0,3%) para obtener una suspensión celular de trabajo ajustado a aproximadamente 20000 UFC/ml. Puede hacerse una serie de mezclas de reacción mezclando una serie de diluciones de factor dos de sueros a ensayar (preferentemente inactivados por calor a 56°C durante 30 minutos) [por ejemplo en un volumen de 50 µl/pocillo] y las 20000 UFC/ml de suspensión de cepa de meningococos a ensayar [por ejemplo en un volumen de 25 µl/pocillo]. Los viales de reacción deben cultivarse (por ejemplo, a 37°C durante 15 minutos) y agitarse (por ejemplo, a 210 rpm). La mezcla de reacción final [por ejemplo en un volumen de 100 µl] contiene adicionalmente una fuente de complemento [tal como el 25% del volumen final de suero de cría de conejo pre-ensayado], y se incuba como anteriormente [por ejemplo, a 37°C durante 60 minutos]. Puede usarse una placa

de microtitulación de 96 pocillos con fondo en U de poliestireno estéril para este ensayo. Puede tomarse una alícuota [por ejemplo, 10 ml] de cada pocillo usando una pipeta multicanal, y verterse por goteo en placas de agar Mueller-Hinton (preferentemente que contienen Isovitalex al 1% y suero de caballo inactivado por calor al 1%) e incubarse (por ejemplo, durante 18 horas a 37°C en CO₂ al 5%). Preferentemente, pueden contarse colonias individuales hasta 80 UFC por alícuota. Pueden usarse las siguientes tres muestras de ensayo como controles: tampón + bacterias + complemento; tampón + bacterias + complemento inactivado; suero + bacterias + complemento inactivado. Los títulos ABS pueden calcularse directamente usando un programa que procesa los datos para dar una medición de la dilución que corresponde al 50% de eliminación celular por un cálculo de regresión.

10 **Ensayos de protección animal**

Como alternativa, la respuesta sinérgica puede caracterizarse por la eficacia de la combinación de antígenos en un ensayo de protección animal. Por ejemplo, pueden usarse los ensayos descritos en el ejemplo 12 o 13. Preferentemente, la cantidad de animales protegidos por la combinación de antígenos se mejora significativamente en comparación con el uso de antígenos en sí mismo, particularmente a dosis sub-óptimas de antígeno.

15 Una vacuna satisfactoria para la prevención de infección por *N. gono* puede requerir más de uno de los siguientes elementos: generación de anticuerpos séricos y/o de mucosa para facilitar la eliminación mediada por el complemento de los gonococos, y/o para potenciar la fagocitosis y eliminación microbiana por leucocitos tales como leucocitos polimorfonucleares, y/o para prevenir la adhesión de los gonococos a los tejidos huésped; también puede participar en la protección una inducción de una respuesta inmune mediada por células.

20 La mejora de la eficacia de una preparación de vacuna gono de ampolla de la invención puede evaluarse analizando la respuesta inmune inducida para anticuerpos séricos y/o de mucosa que tienen propiedades antiadherentes, y/u opsonizantes, y/o actividad bactericida, como se describe por otros (McChesney D y col, Infect. Immun. 36: 1006, 1982; Boslego J y col: Efficacy trial of a purified gonococcal pilus vaccine, en Program and Abstracts of the 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, American Society for Microbiology, 1984; Siegel M y col, J. Infect. Dis 145: 300, 1982; de la Pas, Microbiology, 141 (Pt4): 913-20, 1995).

Recientemente se ha descrito un modelo de ratón de infección genital por *N. gono* (Plante M, J. Infect. Dis., 182: 848-55, 2000). La mejora de la eficacia de una vacuna gono de ampolla de la invención también podría evaluarse por su capacidad de evitar o reducir la colonización por *N. gono* en este modelo de ratón de infección.

Ensayo de bloqueo de la adhesión

30 Como alternativa, la respuesta sinérgica puede caracterizarse por la eficacia de la combinación de antígenos en un ensayo de bloqueo de adhesión. Por ejemplo, puede usarse el ensayo descrito en el Ejemplo 11. Preferentemente, el grado de bloqueo inducido por antisueros creados contra la combinación de antígenos está significativamente mejorado en comparación con el uso de antisueros creados contra los antígenos en sí mismos, particularmente a dosis sub-óptimas de anticuerpo.

35 Composiciones de subunidad

La composición inmunogénica de la invención puede ser una composición de subunidad. Las composiciones de subunidad son composiciones en las cuales los componentes se han aislado y purificado a al menos el 50%, preferentemente a al menos el 60%, 70%, 80%, 90% puros antes de mezclar los componentes para formar la composición antigénica.

40 Una composición de subunidad inmunogénica desvelada preferentemente comprende al menos 2 antígenos seleccionados entre la siguiente lista: FhaB, PilC, Hsf, Hap, NadA, OMP85, proteasa de IgA, AspA, dominio pasajero de AspA, dominio pasajero de Hsf, dominio pasajero de Hap, FrpA, FrpC, TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB, TspA, TspB, PldA, PilQ, FhaC, NspA, y cualquiera o ambos del LPS inmutotipo L2 y LPS inmutotipo L3.

45 Las composiciones de subunidad pueden ser soluciones acuosas de proteínas solubles en agua. Pueden comprender detergente, preferentemente detergente no iónico, zwitteriónico o iónico para solubilizar las partes hidrófobas de los antígenos. Pueden comprender lípidos de modo que puedan formarse estructuras de liposoma, permitiendo la presentación de antígenos con una estructura que abarca una membrana lipídica.

Preparaciones de vesícula de membrana externa

50 *N. meningitidis* serogrupo B (menB) excreta ampollas de membrana externa en cantidades suficientes para permitir su fabricación a escala industrial. También pueden prepararse vesículas de membrana externa mediante el procedimiento de extracción con detergente de las células bacterianas (véase por ejemplo el documento EP 11243).

Una composición inmunogénica también puede comprender una preparación de vesícula de membrana externa que tiene al menos dos antígenos que se han regulado positivamente, de forma recombinante o por otro medio incluyendo cultivo en condiciones de hierro agotado. Ejemplos de antígenos que se regularían positivamente en

dicha preparación de vesícula de membrana externa incluyen; NspA, Hsf, Hap, OMP85, TbpA (alto), TbpA (bajo), LbpA, TbpB, LbpB, PilQ, AspA, TdfH, PorB, HpuB, P2086, NM-ADPRT, MafA, MafB y PldA. Dichas preparaciones también comprenderían cualquiera o ambos de LPS inmunitipo L2 y LPS inmunitipo L3.

5 La fabricación de preparaciones de ampolla a partir de cepas de *Neisseria* puede conseguirse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos para los especialistas en la técnica. Preferentemente, se usan los procedimientos desvelados en los documentos EP 301992, US 5.597.572, EP 11243 o US 4.271.147, Frederikson y col. (NIPH Annals [1991], 14:67-80), Zollinger y col. (J. Clin. Invest. [1979], 63:836-848), Saunders y col. (Infect. Immun. [1999], 67:113-119), Drabick y col. (Vaccine [2000], 18:160-172) o documento WO 01/09350 (Ejemplo 8). En general, se extraen las VME con un detergente, preferentemente desoxicolato, y los ácidos nucleicos se retiran opcionalmente de forma enzimática. La purificación se consigue por ultra-filtración opcionalmente seguida por cromatografía de exclusión de tamaño. Si se incluyen dos o más ampollas diferentes de la invención, pueden combinarse en un único recipiente para formar una preparación multivalente de la invención (aunque una preparación también se considera multivalente si las diferentes ampollas de la invención son composiciones diferentes en recipientes diferentes que se administran al mismo tiempo [la misma visita a un médico] a un huésped). Las preparaciones de VME se esterilizan habitualmente por filtración a través de un filtro de 0,2 µm, y se almacenan preferentemente en una solución de sacarosa (por ejemplo, al 3%) que se sabe que estabiliza las preparaciones de ampolla.

20 La regulación positiva de proteínas dentro de las preparaciones de vesícula de membrana externa puede conseguirse por inserción de una copia adicional de un gen en la cepa de *Neisseria* a partir de la cual se obtiene la preparación de VME. Como alternativa, el promotor de un gen puede intercambiarse por un promotor más fuerte en la cepa de *Neisseria* a partir de la cual se obtiene la preparación de VME. Dichas técnicas se describen en el documento WO01/09350. La regulación positiva de una proteína conducirá a un nivel más elevado de proteína que está presente en la VME en comparación con el nivel de proteína presente en la VME obtenida de *N. meningitidis* no modificada (por ejemplo cepa H44/76). Preferentemente, el nivel será 1,5, 2, 3, 4, 5, 7, 10 ó 20 veces mayor.

25 Cuando se pretende que el LPS sea un antígeno adicional en la VME, puede usarse preferentemente un protocolo que usa una concentración baja de detergente de extracción (por ejemplo, desoxicolato o DOC) en el procedimiento de preparación de VME para conservar altos niveles de LPS unido eliminando al mismo tiempo el LPS particularmente tóxico, mal unido. La concentración de DOC usada es preferentemente del 0-0,5% de DOC, 0,02-0,4% de DOC, 0,04-0,3% de DOC más preferentemente del 0,06-0,2% de DOC o del 0,08-0,15% de DOC mucho más preferentemente es aproximada o exactamente del 0,1% de DOC.

30 "Secuencia promotora más fuerte" se refiere a un elemento de control regulador que aumenta la transcripción para un gen que codifica un antígeno de interés. "Regulación positiva de la expresión" se refiere a cualquier medio para potenciar la expresión de un antígeno de interés, con relación a la de la ampolla no modificada (es decir, de origen natural). Se entiende que la cantidad de 'regulación positiva' variará dependiendo del antígeno particular de interés pero no excederá a una cantidad que altere la integridad de membrana de la ampolla. La regulación positiva de un antígeno se refiere a la expresión que es al menos un 10% superior que la de la ampolla no modificada. Preferentemente, es al menos un 50% superior. Más preferentemente, es al menos un 100% (dos veces) superior. Mucho más preferentemente es 3, 4, 5, 7, 10, 20 veces superior. Como alternativa o adicionalmente, la regulación positiva de la expresión puede referirse a convertir la expresión en no condicional en cambios metabólicos o nutricionales, particularmente en el caso de TbpA, TbpB, LbpA y LbpB. Preferentemente, el nivel de expresión se evalúa cuando las ampollas se han obtenido de bacterias cultivadas en condiciones limitadas de hierro (por ejemplo en presencia de un quelante de hierro).

45 De nuevo por motivos de claridad, las expresiones 'modificación por ingeniería de una cepa bacteriana para producir menos de dicho antígeno' o regulación negativa se refiere a cualquier medio para reducir la expresión de un antígeno (o la expresión de un producto génico funcional) de interés, con relación a la del no modificado (es decir, ampolla de origen natural), preferentemente por delección, de modo que la expresión sea al menos un 10% inferior que la de la ampolla no modificada. Preferentemente, es al menos un 50% inferior y mucho más preferentemente está completamente ausente. Si la proteína regulada negativamente es una enzima o una proteína funcional, la regulación negativa puede conseguirse introduciendo una o más mutaciones que provoquen una reducción del 10%, 20%, 50%, 80% o preferentemente del 100% en la actividad enzimática o funcional.

50 Las etapas de modificación por ingeniería necesarias para modular la expresión de proteínas de *Neisseria* pueden realizarse en una diversidad de modos conocidos para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, pueden insertarse secuencias (por ejemplo, promotores o fases de lectura abierta), y pueden alterarse promotores/genes por la técnica de inserción de transposón. Por ejemplo, para regular positivamente la expresión de un gen, podría insertarse un promotor fuerte mediante un transposón de hasta 2 kb cadena arriba del codón de inicio del gen (más preferentemente 200-600 pb cadena arriba, mucho más preferentemente aproximadamente 400 pb cadena arriba). También puede usarse mutación puntual o delección (particularmente para regular negativamente la expresión de un gen).

60 Dichos procedimientos, sin embargo, pueden ser bastantes inestables o inciertos, y por lo tanto se prefiere que la etapa de modificación por ingeniería se realice mediante un acontecimiento de recombinación homóloga. Preferentemente, el acontecimiento tiene lugar entre una secuencia (una región recombinogénica) de al menos 30

nucleótidos en el cromosoma bacteriano, y una secuencia (una segunda región recombinogénica) de al menos 30 nucleótidos en un vector transformado dentro de la cepa. Preferentemente, las regiones son de 40-1000 nucleótidos, más preferentemente de 100-800 nucleótidos, mucho más preferentemente de 500 nucleótidos). Estas regiones recombinogénicas deben ser suficientemente similares para que sean capaces de hibridar entre sí en condiciones altamente rigurosas.

Los procedimientos usados para realizar los acontecimientos de modificación genética en el presente documento (tal como la regulación positiva o regulación negativa de genes por acontecimientos de recombinación y la introducción de secuencias génicas adicionales en un genoma de *Neisseria*) se describen en el documento WO01/09350. Promotores fuertes típicos que pueden integrarse en *Neisseria* son *porA*, *porB*, *IgtF*, *Opa*, *p110*, *Ist*, y *hpuAB*. Se prefieren *PorA* y *PorB* como promotores fuertes constitutivos. Se ha establecido que la actividad promotora *PorB* está contenida en un fragmento correspondiente a los nucleótidos -1 a -250 cadena arriba del codón de inicio de *porB*.

Regulación positiva de la expresión de antígenos por cultivo en medios de limitación de hierro

La regulación positiva de algunos antígenos en una preparación de vesícula de membrana externa de la invención se consiguen preferentemente aislando vesículas de membrana externa a partir de una cepa parental de *Neisseria* cultivada en condiciones de limitación de hierro. Una baja concentración de hierro en el medio provocará una expresión aumentada de proteínas implicadas en la adquisición de hierro incluyendo *TbpA*, *TbpB*, *LbpA*, *LbpB*, *HpuA*, *HpuB* y *P2086*. La expresión de estas proteínas de este modo está regulada positivamente sin la necesidad de modificar de forma recombinante el gen implicado, por ejemplo insertando un promotor más fuerte o insertando una copia adicional del gen. La invención también abarcaría la regulación positiva de proteína de adquisición de hierro por cultivo en medio de limitación de hierro en el que el gen se ha modificado también de forma recombinante.

La limitación de hierro se consigue por la adición de un quelante de hierro al medio de cultivo. Quelantes de hierro adecuados incluyen 2,2-Dipiridilo, EDDHA (ácido etilendiamina-di(o-hidroxifenilacético) y Desferal (mesilato de deferoxamina, Sigma). El Desferal es el quelante de hierro preferido y se añade al medio de cultivo a una concentración entre 10 y 100 μM , preferentemente 25-75 μM , más preferentemente 50-70 μM , mucho más preferentemente a 60 μM . El contenido de hierro del medio proviene principalmente de los constituyentes del extracto de levadura y peptona de soja y la cantidad presente puede variar entre lotes. Por lo tanto, diferentes concentraciones de Desferal pueden ser óptimas para conseguir la regulación positiva de las proteínas de adquisición de hierro en diferentes lotes de medio. Los especialistas en la técnica deben ser capaces de determinar fácilmente la concentración óptima. En términos básicos, debe añadirse suficiente quelante de hierro al medio para regular positivamente la expresión de la proteína regulada por hierro deseada, pero no tanto como para afectar de forma adversa al cultivo de las bacterias.

Preferentemente, la regulación positiva de las proteínas de adquisición de hierro por cultivo en condiciones limitadas de hierro se combina con la regulación positiva recombinante de otros antígenos de modo que se consiga la vesícula de membrana externa de la invención.

Regulación negativa/retirada de antígenos inmunodominantes variables y no protectores

Muchos antígenos de superficie son variables entre cepas bacterianas y como consecuencia son protectores solamente contra una serie limitada de cepas muy relacionadas. En el presente documento se desvelan vesículas de membrana externa de la invención en que la expresión de otras proteínas está reducida o, preferentemente, está delecionado el gen o genes que codifican proteínas de superficie variables. Dichas deleciones producen una cepa bacteriana que produce ampollas que, cuando se administran en una vacuna, tienen un potencial más fuerte para reactividad cruzada contra diversas cepas debido a la mayor influencia ejercida por proteínas conservadas (retenidas en las membranas externas) sobre el sistema inmune de los vacunados. Ejemplos de dichos antígenos variables en *Neisseria* que pueden regularse negativamente en las composiciones inmunogénicas de ampolla de la invención incluyen *PorA*, *PorB*, *Opa*.

Otros tipos de gen que podrían regularse negativamente o inactivarse son genes que, *in vivo*, pueden activarse fácilmente (expresarse) o inactivarse por la bacteria. Como las proteínas de membrana externa codificadas por dichos genes no siempre están presentes en las bacterias, la presencia de dichas proteínas en las preparaciones de ampolla también puede ser perjudicial para la eficacia de la vacuna por las razones indicadas anteriormente. Un ejemplo preferido para regular negativamente o deleccionar es la proteína *Opc* de *Neisseria*. La inmunidad anti-*Opc* inducida por una vacuna de ampolla que contiene *Opc* tendría solamente capacidad protectora limitada ya que el organismo infectante podría convertirse fácilmente en *Opc*.

Por ejemplo, estos genes variables o no protectores pueden regularse negativamente en la expresión, o inactivarse de forma terminal. Esto tiene la ventaja de concentrar el sistema inmune sobre los mejores antígenos que están presentes en bajas cantidades sobre la superficie externa de las ampollas. Por regulación negativa también se entiende que los bucles inmunodominantes variables expuestos en superficie de las proteínas de membrana externa anteriores pueden alterarse o deleccionarse para hacer que la proteína de membrana externa resultante sea menos inmunodominante.

Los procedimientos para la regulación negativa de la expresión se desvelan en el documento WO01/09350. Las combinaciones preferidas de proteínas a regular negativamente en las composiciones inmunogénicas de ampolla de la invención incluyen PorA y OpA; PorA y OpC; OpA y OpC; PorA y OpA y OpC.

5 Se sabe que existen cuatro diferentes genes Opa en el genoma de meningococos (Aho y col. 1991 Mol. Microbiol. 5:1429-37), por lo tanto cuando se dice que Opa está regulada negativamente en la expresión se entiende que preferentemente 1, 2, 3 o (preferentemente) los 4 genes presentes en meningococos están regulados negativamente. Dicha regulación negativa puede realizarse genéticamente como se describe en el documento WO 01/09350 o buscando cepas de meningococos estables, naturales, halladas fácilmente que no tienen o tienen baja expresión de los loci Opa. Dichas cepas pueden hallarse usando la técnica descrita en Poolman y col (1985 J. Med. Micro. 19:203-209) en que las células que son Opa⁻ tienen un fenotipo diferente a las células que expresan Opa que puede observarse mirando el aspecto de las células en placas o al microscopio. Una vez hallada la cepa, puede demostrarse que es Opa⁻ de forma estable realizando una transferencia de Western sobre los contenidos celulares después de un procesamiento de fermentación para establecer la ausencia de Opa.

15 Cuando se consigue la regulación positiva de algunos antígenos en la vesícula de membrana externa por cultivo en condiciones de limitación de hierro, la proteína variable FrpB (Microbiology 142; 3269-3274, (1996); J. Bacteriol. 181; 2895-2901 (1999)) también estará regulada positivamente. Los inventores han descubierto que es ventajoso regular negativamente la expresión de FrpB en estas circunstancias regulando negativamente la expresión de la proteína completa como se describe en el documento WO01/09350 o delecionando la región o regiones variables de FrpB. Esto asegurará que la respuesta inmune provocada por la composición inmunogénica esté dirigida hacia antígenos que están presentes en un amplio intervalo de cepas. La regulación negativa de FrpB se combina preferentemente con la regulación negativa de PorA y OpA; PorA y OpC; OpA y OpC; PorA y OpA y OpC en las composiciones inmunogénicas de ampolla de la invención.

En una realización alternativa de la invención, FrpB se regula negativamente en vesículas de membrana externa que se han preparado a partir de cepas de *Neisseria* no cultivadas en condiciones de limitación de hierro.

25 Destoxificación de LPS

Las ampollas en las composiciones inmunogénicas de la invención pueden destoxificarse mediante procedimientos para la destoxificación de LPS que se desvelan en el documento WO01/09350. En procedimientos particulares para la destoxificación de LPS de la invención implican la regulación negativa/delección de las enzimas htrB y/o msbB que se desvelan en el documento WO01/09350. Los genes msbB y htrB de *Neisseria* también se llaman 1pxL1 y 1pxL2 respectivamente (documento WO00/26384) y mutaciones de delección de estos genes se caracterizan fenotípicamente por la pérdida en el LOS del mutante msbB⁻ de una cadena acilo secundaria, y la pérdida en el LOS del mutante htrB⁻ de ambas cadenas de acilo secundarias. El documento WO93/14155 y el documento WO 95/03327 describen equivalentes funcionales peptídicos no tóxicos de polimixina B que pueden usarse en composiciones de la invención.

35 Dichos procedimientos se combinan preferentemente con procedimientos de extracción de ampolla que implican bajos niveles de DOC, preferentemente un 0-0,3% de DOC, más preferentemente un 0,05-0,2% de DOC, mucho más preferentemente aproximada o exactamente un 0,1% de DOC.

Procedimientos adicionales de destoxificación de LPS incluyen añadir a las preparaciones de ampolla un equivalente funcional peptídico no tóxico de polimixina B (preferentemente SAEP 2) como se ha descrito anteriormente.

40 Polisacáridos de reactividad cruzada

El aislamiento de ampollas de membrana externa bacterianas a partir de bacterias Gram negativas encapsuladas a menudo provoca la co-purificación de polisacárido capsular. En algunos casos, este material "contaminante" puede resultar ser útil ya que el polisacárido puede potenciar la respuesta inmune conferida por otros componentes de la ampolla. En otros casos sin embargo, la presencia de material polisacárido contaminante en las preparaciones de ampolla bacteriana puede resultar nocivo para el uso de las ampollas en una vacuna. Por ejemplo, se ha demostrado al menos en el caso de *N. meningitidis* que el polisacárido capsular de serogrupo B no confiere inmunidad protectora y es susceptible a inducir una respuesta autoinmune adversa en seres humanos. Por consiguiente, las vesículas de membrana externa de la invención pueden aislarse a partir de una cepa bacteriana para la producción de ampolla, que se ha modificado por ingeniería de modo que esté libre de polisacárido capsular. Las ampollas entonces serán adecuadas para el uso en seres humanos. Un ejemplo particularmente preferido de dicha preparación de ampolla es uno de *N. meningitidis* serogrupo B desprovisto de polisacárido capsular.

55 Esto puede conseguirse usando cepas de producción de ampolla modificadas en las que los genes necesarios para la biosíntesis capsular y/o exportación se han alterado. La inactivación del gen que codifica la biosíntesis o exportación de polisacárido capsular puede conseguirse mutando (mutación puntual, delección o inserción) la región de control, la región codificante o ambas (preferentemente usando las técnicas de recombinación homóloga descritas anteriormente), o por cualquier otro modo para disminuir la función enzimática de dichos genes. Además, la inactivación de los genes de biosíntesis capsular también puede conseguirse por sobreexpresión anti-sentido o mutagénesis por transposón. Un procedimiento preferido es la delección de algunos o todos los genes *cps* de

Neisseria meningitidis necesarios para la biosíntesis y exportación de polisacárido. Para este propósito, puede usarse el plásmido de remplazo (pMF 121 (descrito en Frosh y col. 1990, Mol Microbiol. 4:1215-1218) para proporcionar una mutación que deleccione el grupo génico *cpsCAD* (+ *galE*).

5 La seguridad de los anticuerpos creados contra LPS L3 o L2 se ha cuestionado, debido a la presencia de una estructura similar al grupo oligosacárido lacto-N-neotetraosa (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-) presente en glucoesfingolípidos humanos. Incluso si una gran cantidad de personas se ha vacunado de forma segura con vacunas de vesícula extraídas con desoxicolato que contienen cantidad residual de LPS L3 (G. Bjune y col, Lancet (1991), 338, 1093-1096; GVG. Sierra y col, NIPH ann (1991), 14, 195-210), la delección de la parte terminal del LOS sacárido es ventajosa para prevenir cualquier reacción cruzada con estructuras presentes en la superficie de tejidos humanos. En una realización preferida, la inactivación del gen *IgtB* provoca una estructura LPS intermedia en la que el resto galactosa terminal y el ácido siálico están ausentes (la mutación deja una estructura 4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1- en LOS L2 y L3). Dichos intermedios podrían obtenerse en una cepa LPS L3 y L2. Una versión alternativa y menos preferida (corta) del LPS puede obtenerse inactivando el gen *IgtE*. Una versión alternativa adicional y menos preferida del LPS puede obtenerse inactivando el gen *IgtA*. Si dicha mutación *IgtA*⁻ se selecciona se prefiere también inactivar la expresión de *IgtC* para evitar que se forme el inmunotipo L1 no inmunogénico.

Los mutantes *IgtB*⁻ son más preferidos ya que los inventores han descubierto que este es el truncamiento óptimo para resolver la cuestión de seguridad reteniendo al mismo tiempo un epítipo oligosacárido protector LPS que puede aún inducir una respuesta bactericida de anticuerpo.

20 Por lo tanto, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden preparaciones L2 o L3 (ya sean purificadas o en una ampolla aislada) o preparaciones de ampolla de meningococos en general se obtienen de forma ventajosa a partir de una cepa de *Neisseria* (preferentemente de meningococos) que se ha modificado por ingeniería genética para regular negativamente de forma permanente la expresión del producto génico funcional del gen *IgtB*, *IgtA* o *IgtE*, preferentemente inactivando el gen, más preferentemente deleccionando todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen.

25 Cuando las composiciones inmunogénicas anteriores de la invención se derivan de una cepa de meningococos B, se prefiere adicionalmente que el polisacárido capsular (que también contiene estructuras sacáridas tipo humanas) también esté eliminado. Aunque podrían inactivarse muchos genes para conseguir esto, los inventores han demostrado de forma ventajosa que se prefiere que la cepa de producción de ampolla se haya modificado por ingeniería genética para regular negativamente de forma permanente la expresión del producto génico funcional del gen *siaD* (es decir, regulando negativamente la actividad α -2-8 polisialiltransferasa), preferentemente inactivando el gen, más preferentemente deleccionando todo o parte del promotor y/o fase de lectura abierta del gen. Dicha inactivación se describe en el documento WO 01/09350. La mutación *siaD* (también conocida como *synD*) es la más ventajosa de muchas mutaciones que pueden provocar la eliminación del epítipo similar humano del polisacárido capsular, pero es una de las únicas mutaciones que no tiene efecto sobre la biosíntesis de los epítopos protectores de LOS, siendo de este modo ventajosa en un procedimiento dirigido finalmente a usar LOS como antígeno protector, y tiene un efecto mínimo sobre el crecimiento de la bacteria. Un aspecto preferido de la invención es, por lo tanto, una preparación inmunogénica de ampolla descrita anteriormente que se obtiene de una cepa mutante de meningococos B *IgtE*⁻ *siaD*⁻, *IgtA*⁻ *siaD*⁻ o, preferentemente, *IgtB*⁻ *siaD*⁻. La propia cepa es un aspecto adicional de la invención.

40 Aunque es preferible una mutación *siaD*⁻ por los motivos anteriores, pueden usarse otras mutaciones que inactivan la síntesis de polisacárido capsular de meningococos B. por tanto, la cepa de producción de ampolla puede modificarse por ingeniería genética para regular negativamente de forma permanente la expresión del producto génico funcional de uno o más de los siguientes genes: genes *ctrA*, *ctrB*, *ctrC*, *ctrD*, *synA* (equivalente a *synX* y *siaA*), *synB* (equivalente a *siaB*) o *synC* (equivalente a *siaC*), preferentemente inactivando el gen, más preferentemente deleccionando todo o parte del promotor y/o la fase de lectura abierta del gen. La mutación *IgtE*⁻ puede combinarse con una o más de estas mutaciones. Preferentemente la mutación *IgtB*⁻ se combina con uno o más de estas mutaciones. Un aspecto adicional de la invención es, por lo tanto, una preparación inmunogénica de ampolla descrita anteriormente que se obtiene de dicha cepa mutante combinada de meningococos B.

50 Un locus de *Neisseria* que contiene diversos genes *Igt*, incluyendo *IgtB* e *IgtE*, y su secuencia es conocida en la técnica (véase M. P. Jennings y col, Microbiology 1999, 145, 3013-3021 y referencias citadas en el mismo, y J. Exp. Med. 180:2181-2190 [1994]).

55 Cuando tiene que usarse LOS de longitud completa (no truncado) en el producto final, es deseable que el LOS no esté sialilado (ya que dicho LOS genera una respuesta inmune contra las cepas de meningococos B invasivas más peligrosas que están también no sialiladas). En dicho caso el uso de una cepa de cápsula negativa que tiene un gen *synA* (equivalente a *synX* y *siaA*), *synB* (equivalente a *siaB*) o *synC* (equivalente a *siaC*) deleccionado es ventajosa, ya que dicha mutación también convierte al LOS de menB incapaz de ser sialilado.

En preparaciones de ampolla, particularmente preparaciones extraídas con bajas concentraciones de DOC, puede usarse LPS como antígeno en la composición inmunogénica de la invención. Esto es, sin embargo, ventajoso para regular negativamente/deleccionar/inactivar la función enzimática de los genes/productos génicos de *IgtE*, *IgtA*

(particularmente en combinación con IgtC) o, preferentemente, IgtB para eliminar las estructuras lacto-N-neotetraosa tipo humanas. El locus de *Neisseria* (y secuencia del mismo) que comprende los genes Igt para la biosíntesis de estructura oligosacárida del LPS es conocido en la técnica (Jennings y col, *Microbiology* 1999, 145, 3013-3021 y referencias citadas en el mismo, y *J. Exp. Med.* 180:2181-2190 [1994]). La regulación negativa/delección de IgtB (o producto génico funcional) es preferida ya que deja el epítipo protector LPS intacto.

En preparaciones de ampolla de *N. meningitidis* serogrupo B, es preferida la regulación negativa/delección de siaD e IgtB (aunque también puede usarse una combinación de IgtB⁻ con cualquiera de ctrA⁻, ctrB⁻, ctrC⁻, ctrD⁻, synA⁻ (equivalente a synX⁻ y siaA⁻), synB⁻ (equivalente a siaB⁻) o synC⁻ (equivalente a siaC⁻) en una cepa de producción de ampolla de meningococos B) lo que conduce a una preparación de ampolla con seguridad óptima y retención del epítipo protector LPS.

Un aspecto adicional de la invención es, por lo tanto, una preparación inmunogénica de ampolla descrita anteriormente que se obtiene de dicha cepa mutante combinada de meningococos B.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender al menos una, dos, tres, cuatro o cinco diferentes preparaciones de vesícula de membrana externa. Cuando se incluyen dos o más preparaciones de VME, al menos un antígeno de la invención está regulado positivamente en cada VME. Dichas preparaciones de VME pueden obtenerse de cepas de *Neisseria* de la misma especie y serogrupo o preferentemente de cepas de *Neisseria* de diferente clase, serogrupo, serotipo, subserotipo o inmunotipo. Por ejemplo, una composición inmunogénica puede comprender una o más preparaciones de vesícula de membrana externa que contienen LPS de inmunotipo L2 y una o más preparaciones de vesícula de membrana externa que contienen LPS de inmunotipo L3. Las preparaciones de VME L2 y L3 se derivan preferentemente de una cepa estable que tiene viabilidad de fase mínima en el locus del gen de síntesis de oligosacárido LPS.

Vesículas de membrana externa combinadas con composiciones de subunidad

Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden comprender tanto una composición de subunidad como una vesícula de membrana externa. Existen varios antígenos que son particularmente adecuados para su inclusión en una composición de subunidad debido a su solubilidad. Ejemplos de dichas proteínas incluyen; FhaB, NspA, dominio pasajero de Hsf, dominio pasajero de Hap, dominio pasajero de AspA, AspA, OMP85, TbpB, LbpB, PilQ. La preparación de vesícula de membrana externa tendría al menos un antígeno diferente seleccionado entre la siguiente lista que se ha regulado positivamente de forma recombinante en la vesícula de membrana externa: NspA, Hsf, Hap, OMP85, TbpA (alto), TbpA (bajo), LbpA, TbpB, LbpB, NadA, TspA, TspB, PilC, PilQ, TdfH, PorB, HpuB, P2086, NM-ADPRT, MafA, MafB y PldA; y comprende cualquiera o ambos de LPS inmunotipo L2 y LPS inmunotipo L3.

Composiciones inmunogénicas específicas

En las combinaciones específicas enumeradas a continuación, cuando están presentes combinaciones de antígenos en una ampolla, dichas combinaciones de antígenos deben regularse positivamente como se ha descrito anteriormente.

Una realización de la invención comprende una proteína autotransportadora y una proteína de adquisición de hierro, que son Hsf y TbpA (alto) y/o TbpA (bajo). Dichas composiciones inmunogénicas pueden comprender adicionalmente más preferentemente al menos una de OMP 85, LbpA, LbpB, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, TspA, NadA, TspB, PilQ, FhaC, NspA, PldA, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, FhaB, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, TdfH, PorB, HpuB, P2086, NM-ADPRT, VapD y Hap. Todas las anteriores composiciones inmunogénicas comprenden adicionalmente LPS inmunotipo L3.

Una realización adicional de la invención comprende Hsf y un antígeno adicional seleccionado entre TbpA y Lipo28. La composición inmunogénica anterior comprende adicionalmente LPS inmunotipo L3. Combinaciones desveladas adicionales comprenden Hsf y OMP85 (opcionalmente con Hap, o LbpB); Hsf y Hap (opcionalmente con LbpB u OMP85); Hsf y FrpA (opcionalmente con una o más de Hap, LbpB u OMP85); Hsf y LbpB (opcionalmente con una o más de Hap, OMP85 o FrpA). Como Hsf es una adhesina y una proteína autotransportadora, una combinación particularmente preferida comprende Hsf, OMP85, TbpA, LPS inmunotipo L3, preferentemente en una preparación de ampolla multivalente, que tiene miembros de los cinco grupos de antígenos representados. Preferentemente están presentes tanto TbpA (bajo) como TbpA (alto).

Otra composición inmunogénica desvelada adicional comprende FhaB y al menos un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, TdfH, PorB, PldA, Hap, proteasa de IgA, AspA, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA y TspB, y cualquier o ambos de LPS inmunotipo L2 y LPS inmunotipo L3. Combinaciones preferidas comprenden FhaB y Hsf (opcionalmente con una o más de OMP85, LbpB, Hap o FrpA); FhaB y OMP85 (opcionalmente con una o más de LbpB, Hap o FrpA); FhaB y LbpB (opcionalmente con una o más de Hap o FrpA); FhaB y Hap (opcionalmente con FrpA). Una combinación preferida comprende FhaB, LbpB, Hsf (como una PME) y FrpA que tiene miembros de los cinco grupos de antígeno representados.

- Una composición inmunogénica desvelada adicional comprende NspA y al menos un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, Hap, OMP85, PilQ, AspA, proteasa de IgA, NadA, PldA, Hsf, Hap, TspA, TspB, TdfH, PorB, y cualquiera o ambos de LPS inmunotipo L2 y LPS inmunotipo L3. Combinaciones preferidas comprenden NspA y Hsf (opcionalmente con una o más de OMP85, Hap, LbpA o TbpA); NspA y OMP85 (opcionalmente con una o más de Hap, LbpA o TbpA); NspA y Hap (opcionalmente con una o más de LbpA o TbpA); NspA y LbpA (opcionalmente con TbpA). Una combinación particularmente preferida comprende NspA, Hsf, TbpA, LPS inmunotipo L2 y/o L3, preferentemente en una preparación de ampolla multivalente, que tiene miembros de los cinco grupos de antígenos representados. Preferentemente están presentes tanto TbpA (bajo) como TbpA (alto).
- 5
- 10 Las composiciones inmunogénicas con combinaciones individualizadas de antígenos desveladas en el documento WO 00/25811 no se reivindica en la presente invención. Preferentemente, las composiciones inmunogénicas o vacunas no están cubiertas por la presente invención si tienen un contenido de antígeno que consta únicamente de proteína de unión a transferrina y NspA (o en el caso de una vacuna de ampolla, tiene un contenido de antígeno regulado positivamente o enriquecido que consta únicamente de proteína de unión a transferrina y NspA), sin embargo pueden incluirse combinaciones específicas de antígenos (o antígenos regulados positivamente) que constan de o incluyen NspA así como tanto TbpA (alto) como TbpA (bajo). Opcionalmente, las composiciones o vacunas que comprenden una combinación (subunidad) o regulación positiva (ampolla) de proteína de unión a transferrina y NspA no están reivindicadas.
- 15
- Otra composición inmunogénica de la invención comprende NadA, TbpA, o Lipo28 y LPS inmunotipo L3.
- 20 Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende TbpA (bajo), NadA o Hsf, y LPS inmunotipo L3. Combinaciones desveladas adicionales comprenden TbpA (bajo) y Hsf y LbpA; TbpA (bajo) y OMP85 (opcionalmente con LbpA o Hap o ambas); TbpA (bajo) y LbpA y Hap.
- Una composición inmunogénica adicional de la invención comprende TbpA (alto) NadA, o Hsf, y LPS inmunotipo L3. Combinaciones desveladas adicionalmente comprenden TbpA (alto) y Hsf y LbpA; TbpA (alto) y OMP85 (opcionalmente con LbpA o Hap o ambas); TbpA (alto) y LbpA y Hap.
- 25
- Otra composición inmunogénica desvelada comprende LbpA y al menos un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en NM-ADPRT, VapD, LbpB, TbpB, Hap, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA, TspB, MafA, MafB, proteasa de IgA, AspA, FhaB, Pi1Q, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TdfH, PorB y FhaB y cualquiera o ambos de LPS inmunotipo L2 y LPS inmunotipo L3. Combinaciones preferidas comprenden LbpA y Hsf (opcionalmente con Hap).
- 30
- Una composición inmunogénica desvelada comprende LbpB y al menos un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpA, TbpB, Hap, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA, TspB, MafA, MafB, proteasa de IgA, AspA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TdfH, PorB y FhaB, y cualquiera o ambos de LPS inmunotipo L2 y LPS inmunotipo L3. Combinaciones preferidas comprenden LbpB y Hsf (opcionalmente con OMP85 o Hap); LbpB y OMP85 (opcionalmente con Hap); LbpB y Hap.
- 35
- Una composición inmunogénica desvelada comprende OMP85 y al menos un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, Hap, proteasa de IgA, AspA, Hsf, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, PilQ, TdfH, PorB y FhaB, y cualquier o ambos de LPS inmunotipo L2 y LPS inmunotipo L3. Combinaciones preferidas comprenden OMP85 y Hsf (opcionalmente con LbpA o NspA o ambas); OMP85 y LbpA (opcionalmente con Hap o NspA o ambas); OMP85 y Hap (opcionalmente con NspA).
- 40
- Una composición inmunogénica desvelada comprende Hap y al menos un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, NspA, proteasa de IgA, AspA, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB y FhaB, y cualquier o ambos de LPS inmunotipo L2 y LPS inmunotipo L3.
- 45
- Una composición inmunogénica desvelada comprende cualquiera o ambos de LPS inmunotipo L2 y LPS inmunotipo L3 y al menos un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en LbpB, LbpA, ThpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TspA, TspB, Hap, proteasa de IgA, AspA, NadA, FhaB, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB y FhaB.
- 50
- Combinaciones preferidas de antígenos en una composición inmunogénica de la divulgación incluyen combinaciones que comprenden una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y FhaB; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y PilC; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y NadA; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y PilQ; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y TspA; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y TspB; una proteína de adquisición de hierro, una proteína
- 55

autotransportadora y NspA; más preferentemente que comprenden una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y Hap; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y LbpB; una proteína de adquisición de hierro, una proteína autotransportadora y OMP85 (D15). Más preferentemente, se incorporaría OMP85 (D15) como parte de una preparación de vesícula de membrana externa.

5 Composiciones inmunogénicas de la invención que contienen LPS preferentemente tendrán en LPS conjugado a una fuerte de epítomos T-auxiliares, preferentemente proteínas, y en el caso de LPS en VME, preferentemente proteínas de membrana externa. Una realización particularmente preferida contiene LPS que se ha conjugado (preferentemente intra-ampolla) a PME in situ en la preparación de vesícula de membrana externa (por ejemplo como se ha descrito anteriormente).

10 Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender antígenos (proteínas, LPS y polisacáridos) obtenidos de *Neisseria meningitidis* serogrupos A, B, C, Y, W-135 o *Neisseria gonorrhoeae*.

Preferentemente, las composiciones inmunogénicas o vacunas de la invención no constan de y/o comprenden las combinaciones particulares de identidades de secuencia enumeradas en la tabla que abarca desde la página 3, línea 18 hasta la página 52, línea 2 del documento WO 00/71725 y/o cualquier combinación individual descrita en los ejemplos 1-11 del documento WO 00/71725.

15 Preferentemente, cualquier combinación individualizada desvelada en el documento WO 01/52885 no está reivindicada en la presente invención.

Combinaciones adicionales

20 La composición inmunogénica de la invención puede comprender adicionalmente polisacáridos u oligosacáridos capsulares bacterianos. Los polisacáridos u oligosacáridos capsulares pueden obtenerse de uno o más de: *Neisseria meningitidis* serogrupo A, C, Y, y/o W-135, *Haemophilus influenzae b*, *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos del grupo A, estreptococos del grupo B, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Un aspecto adicional de la invención son combinaciones de vacuna que comprenden la composición antigénica de la invención con otros antígenos que se usan ventajosamente contra ciertas patologías incluyendo las asociadas con virus o bacterias Gram positivas.

25 En una combinación preferida, las composiciones antigénicas de la invención se formulan con 1, 2, 3 o preferentemente los 4 siguientes polisacáridos u oligosacáridos capsulares de meningococos que pueden ser sencillo o estar conjugados a una proteína vehículo: A, C, Y o W-135. Preferentemente, las composiciones inmunogénicas de la invención se formulan con A y C; o C; o C e Y. Dicha vacuna que contiene proteínas de *N. meningitidis*, preferentemente serogrupo B puede usarse ventajosamente como vacuna global contra meningococos.

30 En una realización preferida adicional, las composiciones antigénicas de la invención, preferentemente formuladas con 1, 2, 3 o los 4 polisacáridos u oligosacáridos capsulares de meningococos sencillos o conjugados A, C, Y o W-135 (como se ha descrito anteriormente), se formulan con un polisacárido u oligosacáridos capsular de *H. influenzae b* conjugado, y/o uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares de neumococos sencillos o conjugados. Opcionalmente, la vacuna también puede comprender uno o más antígenos proteicos que pueden proteger al huésped contra infección por *Streptococcus pneumoniae*. Dicha vacuna puede usarse ventajosamente como vacuna global contra la meningitis.

35 En una realización preferida adicional más, la composición inmunogénica de la invención se formula con polisacáridos u oligosacáridos capsulares obtenidos de uno o más de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae b*, *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos del grupo A, estreptococos del grupo B, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*. Los antígenos polisacáridos capsulares de neumococos se seleccionan preferentemente entre los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (mucho más preferentemente entre los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares PRP de *Haemophilus influenzae*. Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares Tipo 5, Tipo 8 o 336 de *Staphylococcus aureus*. Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares Tipo I, Tipo II o Tipo III de *Staphylococcus epidermidis*. Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares Tipo Ia, Tipo Ic, Tipo II o Tipo III de estreptococos del grupo B. Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares de estreptococos del grupo A, preferentemente comprendiendo adicionalmente al menos una proteína M y más preferentemente múltiples tipos de proteína M.

40 Dichos polisacáridos capsulares pueden estar no conjugado o conjugados a una proteína vehículo tal como toxoide tetánico, fragmento C de toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197, pneumolisina, Proteína D (documento US6342224). El conjugado polisacárido puede prepararse por cualquier técnica de acoplamiento conocida. Por ejemplo, el polisacárido puede acoplarse mediante un enlace tioéter. Este procedimiento de conjugación se basa en la activación del polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster cianato. El polisacárido activado puede por tanto acoplarse directamente o mediante un grupo espaciador a un grupo amino en la proteína vehículo. Preferentemente, el éster cianato se acopla con hexano diamina y el polisacárido

amino-derivatizado se conjuga a la proteína vehículo usando química de heteroligamiento que implica la formación del enlace tioéter. Dichos conjugados se describen en la solicitud publicada PCT WO93/15760 Uniformed Services University.

- 5 Los conjugados también pueden prepararse por procedimientos de aminación reductora directa como se describe en el documento US 4365170 (Jennings) y el documento US 4673574 (Anderson). Otros procedimientos se describen en los documentos EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508. Un procedimiento adicional implica el acoplamiento de polisacárido activado con bromuro de cianógeno derivatizado con hidrazida de ácido adípico (ADH) a la proteína vehículo por condensación de carbodiimida (Chu C. y col. Infect. Immunity, 1983 245 256). Cuando se incluyen oligosacáridos, se prefiere que estén conjugados.
- 10 Antígenos proteicos de neumococos preferidos son aquellas proteínas de neumococos que están expuestas sobre la superficie externa de los neumococos (capaces de reconocerse por el sistema inmune del huésped durante al menos parte del ciclo vital de los neumococos), o son proteínas que se secretan o liberan por los neumococos. Más preferentemente, la proteína es una toxina, adhesina, transductor de señales de 2-componentes, o lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae*, o fragmentos de las mismas. Proteínas particularmente preferidas incluyen, aunque sin limitación: pneumolisina (preferentemente destoxicada por tratamiento químico o mutación) [Mitchell y col. Nucleic Acids Res. 1990 Jul 11; 18(13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from Streptococcus pneumoniae types 1 y 2.", Mitchell y col. Biochim Biophys Acta 1989 Ene 23; 1007 (1): 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in Escherichia coli: rapid purification and biological properties.", documento WO 96/05859 (A. Cyanamid), documento WO 90/06951 (Paton y col.), documento WO 99/03884 (NAVA)]; PspA y variantes de
- 15 deleción transmembrana de las misma (documento US 5804193 - Briles y col.); PspC y variantes de deleción transmembrana de la misma (documento WO 97/09994 - Briles y col.); PsaA y variantes de deleción transmembrana de la misma (Berry y Paton, Infect Immun 1996 Dic; 64(12):5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of Streptococcus pneumoniae"); proteínas de unión a colina de neumococos y variantes de deleción transmembrana de las mismas; CbpA y variantes de deleción transmembrana de la misma (documento WO 97/41151; documento WO 99/51266); gliceraldehído-3-fosfato - deshidrogenasa (Infect Immun. 1996 64: 3544); HSP70 (documento WO 96/40928); PcpA (Sanchez-Beato y col. FEMS Microbiol Lett 1998, 164:207-14); proteína tipo M, (documento EP 0837130) y adhesina 18627 (documento EP 0834568). Antígenos proteicos de neumococos preferidos adicionales son los desvelados en el documento WO 98/18931, particularmente los seleccionados en el documento WO 98/18930 y el documento PCT/US99/30390.
- 20
- 25
- 30 La composición inmunogénica/vacuna de la invención también puede comprender opcionalmente las preparaciones de vesícula de membrana externa preparadas a partir de otras bacterias Gram negativas, por ejemplo *Moraxella catarrhalis* o *Haemophilus influenzae*.

Preparaciones de ampolla de *Moraxella catarrhalis*

- 35 Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender adicionalmente preparaciones de VME obtenidas de *Moraxella catarrhalis*. Pueden obtenerse preparaciones de VME modificadas por ingeniería de *Moraxella catarrhalis* como se describe en el documento WO01/09350. Se prefiere uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) para regulación positiva: OMP106 (documento WO 97/41731 y documento WO 96/34960), HasR (documento PCT/EP99/03824), PilQ (documento PCT/EP99/03823), OMP85 (documento PCT/EP00/01468), lipo06 (documento GB 9917977,2), lipo10 (documento GB 9918208,1), lipo11 (documento GB 9918302,2), lipo18 (documento GB 9918038,2), P6 (documento PCT/EP99/03038), ompCD, CopB (Helminen ME, y col. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010), D15 (documento PCT/EP99/03822), OmpI1A (documento PCT/EP99/06781), Hly3 (documento PCT/EP99/03257), LbpA y LbpB (documento WO 98/55606), TbpA y TbpB (documento WO 97/13785 y documento WO 97/32980), OmpE, UspA1 y UspA2 (documento WO 93/03761), y Omp21. También se prefieren como genes que pueden introducirse de forma heteróloga en otras bacterias Gram-
- 40
- 45 negativas.

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para regulación negativa: CopB, OMP106, OmpBI, TbpA, TbpB, LbpA, y LbpB.

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para regulación negativa: htrB, msbB y 1pxK.

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para regulación positiva: pmrA, pmrB, pmrE, y pmrF.

Preparaciones de ampolla de *Haemophilus influenzae*

- 50 Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender adicionalmente preparaciones de VME obtenidas de *Haemophilus influenzae*. Pueden obtenerse preparaciones de VME modificadas por ingeniería de *Haemophilus influenzae* como se describe en el documento WO01/09350. Se prefiere uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectores) para regulación positiva: D15 (documento WO 94/12641), P6 (documento EP 281673), TbpA (documento WO96/40929; documento WO95/13370), TbpB (documento WO96/40929; documento WO95/13370), P2, P5 (documento WO 94/26304), OMP26 (documento WO 97/01638), HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, Hia, Hsf, Hap, Hin47, y Hif (todos los genes en este operón deben regularse positivamente para regular positivamente la pilina). También se prefieren como genes que pueden introducirse de
- 55

forma heteróloga en otras bacterias Gram-negativas.

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para regulación negativa: P2, P5, Hif, proteasa de IgA1, HgpA, HgpB, HMW1, HMW2, Hxu, htrB, msbB y 1pxK.

Se prefiere uno o más de los siguientes genes para regulación positiva: pmrA, pmrB, pmrE, y pmrF.

- 5 La composición inmunogénica/vacuna de la invención también puede comprender opcionalmente antígenos que proporcionan protección contra una o más infecciones de difteria, tétanos y *Bordetella pertussis*. El componente pertussis puede ser la célula completa de *B. pertussis* (Pw) inactivada o pertussis acelular (Pa) que contiene al menos un antígeno (preferentemente 2 o los 3) de PT, FHA y pertactina de 69 kDa. Típicamente, los antígenos que proporcionan protección contra difteria y tétanos serían toxoide diftérico y toxoide tetánico. Los toxoides pueden ser
10 toxinas inactivadas químicamente o toxinas inactivadas por la introducción de mutaciones puntuales.

La composición inmunogénica/vacuna también puede comprender opcionalmente uno o más antígenos que pueden proteger a un huésped contra *Haemophilus influenzae* no tipable, VSR y/o uno o más antígenos que pueden proteger al huésped contra el virus de la influenza. Dicha vacuna puede usarse ventajosamente como vacuna global contra la otitis media.

- 15 Antígenos proteicos preferidos de *H. influenzae* no tipable incluyen la proteína fimbrina (documento US 5766608) y fusiones que comprenden péptidos de la misma (por ejemplo la fusión LB1) (documento US 5843464 - Ohio State Research Foundation), OMP26, P6, proteína D, TbpA, TbpB, Hia, Hmw1, Hmw2, Hap, y D15.

- 20 Antígenos preferidos del virus de la influenza incluyen el virus completo, vivo o inactivado, el virus de la influenza dividido, cultivado en huevos o células MDCK, o células Vero o virosomas flu completos (como se describe por R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tales como HA, NP, NA, o proteínas M, o combinaciones de las mismas.

Los antígenos de VSR (virus sincitial respiratorio) preferidos incluyen la glucoproteína F, la glucoproteína G, la proteína HN, la proteína M o derivados de las mismas.

- 25 Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden incluir proteínas de *Moraxella catarrhalis* incluyendo TbpA (documento WO97/13785; documento WO99/52947); TbpB (documento WO97/13785; documento WO99/52947; Mathers y col. FEMS Immunol Med Microbiol 1997 19; 231-236; Myers y col. Infect Immun 1998 66; 4183-4192), LbpA, LbpB (Du y col. Infect Immun 1998 66; 3656-3665), UspA1, UspA2 (Aebi y col. Infect Immun. 1997 65; 4367-4377), OMP106 (documento US6214981), receptor dependiente de Ton-B (documento WO00/78968), CopB (Sethi y col. Infect. Immun. 1997 65; 3666-3671), y receptor HasR (documento WO00/78968);
30 proteínas de *Haemophilus influenzae* incluyendo HMW (St Geme y col. Infect Immun 1998 66; 364-368), Hia (St Geme y col. J. Bacteriol. 2000 182; 6005-6013), Tbp1 (documento WO96/40929; documento WO95/13370), Tbp2 (documento WO96/40929; documento WO95/13370; Gray-Owen y col Infect Immun 1995 63; 1201-1210), LbpA, LbpB (Schryvers y col. 1989, 29:121-130), HasR, receptor dependiente de TonB (Fleish-mann y col. Science 1995 269; 496-512), proteína de unión a hemoglobina, HhuA (Cope y col. Infect Immun 2000 68; 4092-4101), HgpA (Maciver y col. Infect Immun 1996 64; 3703-3712), HgbA, HgbB y HgbC (Jin y col. Infect Immun 1996 64; 3134-3141), HxuA (Cope y col. Mol Microbiol 1994 13; 863-873), HxuC (Cope y col. Infect Immun 2001 69; 2353-2363);
35 proteínas de *Neisseria meningitidis* incluyendo Tbp1, Tbp2, FbpA, FbpB, BfrA, BfrB (Tettelin y col. Science 2000 287; 1809-1815), LbpA, LbpB y HmbR.

Formulaciones de vacuna

- 40 Una realización preferida de la invención es la formulación de la composición inmunogénica de la invención en una vacuna que también puede comprender un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- La fabricación de preparaciones de vesícula de membrana externa a partir de cualquiera de las cepas modificadas mencionadas anteriormente puede conseguirse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos para los especialistas en la técnica. Preferentemente, se usan los procedimientos desvelados en los documentos EP 301992,
45 US 5.597.572, EP 11243 o US 4.271.147. Más preferentemente, se usa el procedimiento descrito en el documento WO 01/09350.

La preparación de vacuna está descrita en líneas generales en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York).

- 50 Las composiciones antigénicas de la presente invención pueden adyuvantarse en la formulación de vacuna de la invención. Adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio (particularmente carbonato de calcio), hierro o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos catiónica o aniónicamente derivatizados, o polifosfazenos.

5 Los sistemas adyuvantes Th1 adecuados que pueden usarse incluyen, monofosforil lípido A, particularmente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado, y una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) junto con una sal de aluminio (preferentemente fosfato de aluminio). Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se desvela en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que QS21 está inactivado con colesterol como se desvela en el documento WO96/33739. Una formulación adyuvante particularmente potente que implica QS21 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento W095/17210 y es una formulación preferida.

10 La vacuna puede comprender una saponina, más preferentemente QS21. También puede comprender una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Los oligonucleótidos que contienen CpG no metilado (documento WO 96/02555) también son inductores preferentes de una respuesta TH1 y son adecuados para su uso en la presente invención.

15 La preparación de vacuna de la presente invención puede usarse para proteger o tratar a un mamífero susceptible a infección, administrando dicha vacuna a través de la vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de la vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Por tanto se desvela en el presente documento un procedimiento para inmunizar a un huésped humano contra una enfermedad causada por infección de una bacteria gram-negativa, comprendiendo dicho procedimiento administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la preparación de VME de la presente invención.

20 La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona a una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en vacunados típicos. Dicha cantidad variará dependiendo del inmunógeno específico empleado y del modo en que se presente. Generalmente, se espera que cada dosis comprenda 1-100 µg de antígeno proteico o preparación de VME, preferentemente 5-50 µg, y más típicamente en el intervalo de 5 - 25 µg.

25 Una cantidad óptima para una vacuna particular puede determinarse por estudios convencionales que implican la observación de respuestas inmunes apropiadas en sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas adecuadamente.

Las vacunas de la invención son preferentemente inmunoprotectoras y no tóxicas y adecuadas para uso pediátrico o adolescente.

Por uso pediátrico se entiende el uso en bebés de menos de 4 años de edad.

30 Por inmunoprotectora se entiende que la ABS y/o el modelo de protección animal y/o el ensayo de bloqueo de adhesión descritos anteriormente se cumplen satisfactoriamente.

Por no tóxica se entiende que hay un nivel no mayor del satisfactorio de actividad endotoxina en la vacuna medido por los ensayos LAL y de pirogenicidad bien conocidos.

Polinucleótidos

35 "Polinucleótido" generalmente se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. "Polinucleótidos" incluyen, sin limitación, ADN mono o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más típicamente, bicatenario o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además,
40 "polinucleótido" se refiere a regiones de triple hebra que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con estructuras modificadas para la estabilidad o por otros motivos. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se ha hecho una diversidad de modificaciones al ADN y ARN; por tanto, "polinucleótido" abarca formas modificadas química, enzimática o metabólicamente de polinucleótidos hallados típicamente en la naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y
45 células. "Polinucleótido" también abarca polinucleótidos relativamente cortos, a menudo mencionados como oligonucleótidos.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a una formulación inmunológica/de vacuna que comprende uno o más polinucleótidos. Dichas técnicas son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Wolff y col., Science, (1990) 247: 1465-8.

Dichas vacunas comprenden uno o más polinucleótidos que codifican una pluralidad de proteínas correspondientes a combinaciones de proteína de la invención descritas anteriormente.

55 La expresión de proteínas a partir de dichos polinucleótidos estaría bajo el control de un promotor eucariota capaz de dirigir la expresión dentro de una célula de mamífero. El polinucleótido puede comprender adicionalmente secuencia que codifique otros antígenos. Ejemplos de promotores eucariotas que podrían dirigir la expresión

incluyen promotores virales de virus incluyendo promotores adenovirales, promotores retrovirales. Como alternativa, podrían usarse promotores de mamífero para dirigir la expresión.

Aspectos adicionales

5 Otro aspecto de la presente divulgación implica un procedimiento para el tratamiento o prevención de enfermedad por *Neisseria* que comprende administrar una dosis protectora (o cantidad eficaz) de la vacuna de la invención a un huésped que lo necesite. Podría prevenirse o tratarse ventajosamente una infección por *Neisseria meningitidis* serogrupos A, B, C, Y o W135 y/o *Neisseria gonorrhoeae*.

10 La invención incluye un uso de la vacuna de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de infección por *Neisseria*. De nuevo, infección por *Neisseria* abarca infección por *Neisseria meningitidis* serogrupos A, B, C, Y, W-135 y/o *Neisseria gonorrhoeae*.

Otro aspecto de la divulgación es una cepa de *Neisseria* modificada por ingeniería genética a partir de la cual puede obtener una vesícula de membrana externa de la invención (que tiene al menos dos proteínas de la invención reguladas positivamente de forma recombinante, como se ha descrito anteriormente). Dichas cepas de *Neisseria* pueden ser *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae*.

15 La cepa también puede modificarse por ingeniería (como se ha descrito anteriormente) para regular negativamente la expresión de otras proteínas de *Neisseria* incluyendo la expresión de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho de LgtB, LgtE, SiaD, OpC, OpA, PorA, FrpB, mshB y HtrB. Combinaciones preferidas para regulación negativa incluyen regulación negativa (preferentemente deleición) de al menos LgtB y SiaD, regulación negativa de al menos PorA y OpC, regulación negativa de al menos PorA y OpA y regulación negativa de al menos PorA, OpA y OpC.

20 Aspectos adicionales de la invención son procedimientos para preparar la composición inmunogénica o vacuna de la invención. Éstos incluyen un procedimiento que comprende una etapa de mezclar juntos al menos dos antígenos o proteínas aisladas de *Neisseria*, que pueden estar presentes en forma de ampollas obtenidas de las cepas de *Neisseria* de la invención, para preparar una composición inmunogénica de la invención, y un procedimiento para preparar la vacuna de la invención que comprende la etapa de combinar la composición inmunogénica de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 También se incluyen en la invención procedimientos para preparar la composición inmunogénica de la invención que comprende la etapa de aislar vesículas de membrana externa de la invención a partir de un cultivo de *Neisseria*. Dicho procedimiento puede implicar una etapa adicional de combinar al menos dos preparaciones de vesícula de membrana externa, preferentemente en las que al menos una preparación de vesícula de membrana externa contiene LPS de inmunotipo L2 y al menos una preparación de vesícula de membrana externa contiene LPS de inmunotipo L3. La invención también incluye procedimientos en los que las vesículas de membrana externa se aíslan por extracción con una concentración de DOC del 0 - 0,5%. Se usan concentraciones de DOC del 0,3%-0,5% para minimizar el contenido de LPS. En la preparación de VME en las que LPS tiene que conservarse como antígeno, se usan concentraciones de DOC del 0-0,3%, preferentemente del 0,05%-0,2%, mucho más preferentemente de aproximadamente el 0,1% para la extracción.

Vacunas de células completas fantasma o inactivadas

30 Los inventores prevén que las mejoras anteriores a las preparaciones de ampolla y vacunas pueden extenderse fácilmente a preparaciones y vacunas de células completas fantasma o inactivadas (con ventajas idénticas). Las cepas Gram-negativas modificadas de la invención a partir de las cuales se preparan las preparaciones de ampolla también pueden usarse para preparar preparaciones de células completas fantasma o inactivadas. Los procedimientos para preparar preparaciones fantasma (células vacías con envueltas intactas) a partir de cepas Gram-negativas son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo el documento WO 92/01791). Los procedimientos para inactivar células completas para preparar preparaciones de células inactivadas para su uso en vacunas son también bien conocidos. Las expresiones 'preparaciones de ampolla [o de VME]' y 'vacunas de ampolla' [o de VME] así como los procedimientos descritos durante todo el presente documento son, por lo tanto, aplicables a las expresiones 'preparación fantasma' y 'vacuna fantasma', y 'preparación de células completas inactivadas' y 'vacuna de células completas inactivadas', respectivamente, para los propósitos de la presente invención.

Anticuerpos e inmunización pasiva

50 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para preparar una inmunoglobulina para su uso en la prevención o tratamiento de infección por *Neisseria* que comprende las etapas de inmunizar a un destinatario con la vacuna de la invención y aislar la inmunoglobulina del destinatario. Una inmunoglobulina preparada por este procedimiento es un aspecto adicional de la invención. Se desvela en el presente documento una composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable que podría usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedad por *Neisseria*. Un procedimiento para el tratamiento o prevención de infección por *Neisseria* que comprende una etapa de administrar a un paciente una cantidad eficaz de la preparación farmacéutica de la invención es un aspecto adicional de la divulgación.

5 Los inóculos para la producción de anticuerpos policlonales se preparan típicamente dispersando la composición antigénica en un diluyente fisiológicamente tolerable tal como solución salina u otros adyuvantes adecuados para uso humano para formar una composición acuosa. Se administra una cantidad inmunoestimuladora de inóculo a un mamífero y el mamífero inoculado después se mantiene durante un tiempo suficiente para que la composición antigénica induzca anticuerpos protectores.

Los anticuerpos pueden aislarse al grado deseado por técnicas bien conocidas tales como cromatografía de afinidad (Harlow y Lane Antibodies; a laboratory manual 1988).

10 Los anticuerpos pueden incluir preparaciones de antisuero a partir de una diversidad de animales habitualmente usados, por ejemplo cabras, primates, burros, cerdos, caballos, cobayas, ratas o seres humanos. Los animales se exanguinan y se recupera el suero.

15 Una inmunoglobulina producida de acuerdo con la presente divulgación puede incluir anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo o subfragmentos. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidad dual para dos o más antígenos de la invención. También pueden ser fragmentos por ejemplo F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares incluyendo fragmentos híbridos. Una inmunoglobulina también incluye proteínas naturales, sintéticas o modificadas por ingeniería genética que actúan como un anticuerpo uniéndose a antígenos específicos para formar un complejo.

20 Una vacuna de la presente invención puede administrarse a un destinatario que después actúa como fuente de inmunoglobulina, producida en respuesta a estimulación por la vacuna específica. Un sujeto tratado de este modo donaría plasma a partir del cual se obtendría hiperinmunoglobulina mediante metodología de fraccionamiento convencional de plasma. La hiperinmunoglobulina se administraría a otro sujeto para conferir resistencia o tratar infección por *Neisseria*. Las hiperinmunoglobulinas de la presente divulgación son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de enfermedad por *Neisseria* en bebés, individuos inmunocomprometidos o cuando se requiere tratamiento y no hay tiempo para que el individuo produzca anticuerpos en respuesta a la vacunación. Un aspecto adicional de la divulgación es una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales (o fragmentos de los mismos; preferentemente humanos o humanizados) reactivos contra al menos dos constituyentes de la composición inmunogénica de la invención, que podrían usarse para tratar o prevenir la infección por bacterias Gram negativas, preferentemente *Neisseria*, más preferentemente *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae* y mucho más preferentemente *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

25 Dichas composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos monoclonales que pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase, por ejemplo IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidad para dos o más antígenos de la invención. También pueden ser fragmentos, por ejemplo F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares incluyendo fragmentos híbridos.

30 Los procedimientos para preparar anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica y pueden incluir la fusión de esplenocitos con células de mieloma (Kohler y Milstein 1975 Nature 256; 495; Antibodies - a laboratory manual Harlow y Lane 1988). Como alternativa, pueden obtenerse fragmentos Fv monoclonales explorando una biblioteca de presentación en fagos adecuada (Vaughan TJ y col. 1998 Nature Biotechnology 16; 535). Los anticuerpos monoclonales pueden humanizarse o humanizarse en parte por procedimientos conocidos.

35 Todas las referencias o solicitudes de patente citadas dentro la presente memoria descriptiva de patente se incorporan por referencia en el presente documento.

Las expresiones "que comprende", "comprenden" y "comprende" en el presente documento los inventores pretenden que sean opcionalmente sustituibles con las expresiones "que consiste en", "consisten en", y "consiste en", respectivamente, en todos los casos.

Procedimiento de aplicación industrial de la invención

45 Los siguientes ejemplos se realizan usando técnicas convencionales, que son bien conocidas y rutinarias para los especialistas en la técnica, excepto cuando se describe de otro modo en detalle. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

Ejemplo 1: Procedimientos para la construcción de cepas de *Neisseria meningitidis* serogrupo B usadas en preparaciones de vesícula de membrana externa.

50 El documento WO01/09350 proporciona procedimientos detallados para preparar vesículas de membrana externa y para manipular las cepas bacterianas a partir de las cuales se obtienen las vesículas de membrana externa. Cuando las vesículas de membrana externa tienen que retener las lipoproteínas tales como TbpB y/o lipopolisacáridos, se prefieren procedimientos de aislamiento con bajos niveles o niveles ausentes de desoxicolato.

55 **Ejemplo 2: Regulación positiva del antígeno proteico Hsf en una cepa recombinante de *Neisseria meningitidis* serogrupo B que carece de genes *cps* funcionales pero que expresa *PorA*.**

Como se describe en los ejemplos del documento WO01/09350, en ciertos países, la presencia de PorA en vesículas de membrana externa puede ser ventajosa, y puede fortalecer la eficacia de la vacuna de ampollas mejoradas recombinantes. En el siguiente ejemplo, se ha usado un vector pCMK(+) modificado para regular positivamente la expresión del antígeno proteico Hsf en una cepa que carece de genes *cps* funcionales pero que expresa PorA. El vector pCMK(+) original contiene un promotor quimérico *porA/lacO* reprimido en el huésped *E. coli* que expresa *lacI^q* pero es transcripcionalmente activo en *Neisseria meningitidis*. En el pCMK(+) modificado, se usó el promotor nativo *porA* para dirigir la transcripción del gen *hsf*. El gen que codifica Hsf se amplificó por PCR usando los cebadores oligonucleotídicos HSF 01-NdeI y HSF 02-NheI, presentados en la siguiente tabla. A causa de la secuencia del cebador HSF 01-NdeI, la proteína Hsf expresada contendrá dos restos de metionina en el extremo 5'. Las condiciones usadas para la amplificación por PCR fueron las descritas por el proveedor (ADN polimerasa HiFi, Boehringer Mannheim, GmbH). El ciclado térmico fue el siguiente: 25 veces (94°C 1 min., 48°C 1 min., 72°C 3 min.) y 1 vez (72°C 10 min., 4°C hasta la recuperación). El amplicón correspondiente se clonó posteriormente en los sitios de restricción correspondientes del vector de liberación pCMK(+). En este plásmido recombinante, denominado pCMK(+)-Hsf, se delecionó *lacO* presente en el promotor quimérico *porA/lacO* por una estrategia de PCR recombinante. El plásmido pCMK(+)-Hsf se usó como molde para amplificar por PCR 2 fragmentos de ADN diferentes:

- el fragmento 1 contiene la región recombinogénica 5' de *porA*, el gen de resistencia a kanamicina y el promotor *porA*. Los cebadores oligonucleotídicos usados, RP1 (SaclI) y RP2, se presentan en la siguiente tabla. El cebador RP1 es homólogo a la secuencia justo cadena arriba del operador *lac*.
- el fragmento 2 contiene la secuencia de Shine-Dalgarno del gen *porA*, el gen *hsf* y la región recombinogénica 3' de *porA*. Los cebadores oligonucleotídicos usados, RP3 y RP4 (*Apal*), se presentan en la siguiente tabla. El cebador RP3 es homólogo a la secuencia justo cadena abajo del operador *lac*. El extremo 3' del fragmento 1 y el extremo 5' del fragmento 2 tienen 48 bases solapantes. Se usaron 500 ng de cada PCR (1 y 2) para una reacción de PCR final usando los cebadores RP1 y RP4. El amplicón final obtenido se subclonó en el vector pSL1180 restringido con SaclI y Apal. El plásmido modificado pCMK(+)-Hsf se purificó a gran escala usando el kit maxiprep de QIAGEN y se usaron 2 µg de este material para transformar una cepa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B que carecía de *cps* funcionales. Para conservar la expresión de *porA*, se seleccionó la integración resultante de un único cruce por una combinación de procedimientos de exploración por PCR y transferencia de Western. Los clones resistentes a kanamicina positivos en ensayo por PCR específica de *porA* y transferencia de Western se almacenaron a -70°C como soluciones madre en glicerol y se usaron para estudios adicionales. Las bacterias (correspondientes a aproximadamente 5·10⁸ bacterias) se resuspendieron en 50 µl de tampón PAGE-SDS, se congelaron (-20°C) / hirvieron (100°C) tres veces y después se separaron por electroforesis PAGE-SDS en un gel al 12,5%. La expresión de Hsf se examinó en lisados bacterianos de célula completa (WCBL) obtenidos de *NmB* [Cps-, PorA+] o *NmB* [Cps-, PorA+, Hsf+]. La tinción con Coomassie detectó un aumento significativo en la expresión de Hsf (con respecto al nivel endógeno de Hsf). Este resultado confirma que el vector modificado pCMK(+)-Hsf es funcional y puede usarse satisfactoriamente para regular positivamente la expresión de proteínas de membrana externa, sin suprimir la producción del antígeno proteico principal de membrana externa PorA.

40 Oligonucleótidos usados en este trabajo

Oligonucleótidos	Secuencia	Observaciones
Hsf 01-Nde	5'-GGA ATT CCA TAT GAT GAA CAA AAT ATA CCG C-3'	sitio de clonación <i>NdeI</i>
Hsf 02-Nhe	5'-GTA GCT AGC TAG CTT ACC ACT GAT AAC CGA C -3'	sitio de clonación <i>NheI</i>
GFP-mut-Asn	5'-AAC TGC AGA ATT AAT ATG AAA GGA GAA GAA CTT TTC-3'	sitio de clonación <i>AsnI</i> compatible con <i>NdeI</i>
GFP-Spe	5'-GAC ATA CTA GTT TAT TTG TAG AGC TCA TCC ATG-3'	sitio de clonación <i>SpeI</i> compatible con <i>NheI</i>
RP1 (SaclI)	5'-TCC CCG CGG GCC GTC TGA ATA CAT CCC GTC-3'	sitio de clonación <i>SaclI</i>
RP2	5'-CAT ATG GGC TTC CTT TTG TAA ATT TGA GGG CAA ACA CCC GAT ACG TCT TCA-3'	
RP3	5'-AGA CGT ATC GGG TGT TTG CCC TCA AAT TTA CAA AAG GAA GCC CAT ATG-3'	

(continuación)

Oligonucleótidos	Secuencia	Observaciones
RP4 (Apal)	5'-GGG TAT TCC GGG CCC TTC AGA CGG CGC AGC AGG -3'	sitio de clonación <i>Apal</i>

Ejemplo 3: Regulación positiva del gen *tbpA* de *N. meningitidis* serogrupo B por remplazo de promotor.

El objetivo del experimento fue reemplazar la región promotora endógena del gen *tbpA* por el promotor *porA* fuerte, para regular positivamente la producción del antígeno TbpA. Para ese propósito, se construyó un plásmido de
 5 remplazo de promotor usando metodologías de clonación con *E. coli*. Se descubrió una región ADN (731 pb) localizada cadena arriba de la secuencia codificante de *tbpA* en la base de datos privada Incyte PathoSeq de *Neisseria meningitidis* cepa ATCC 13090. Este ADN contiene la secuencia que codifica el antígeno TbpB. Los genes están organizados en un operón. El gen *tbpB* se delecionará y reemplazará por el casete promotor CmR/*porA*. Para ese propósito, se amplificó un fragmento de ADN de 3218 pb correspondiente a la región flanqueante 5' de 509 pb
 10 del gen *tbpB*, la secuencia codificante de *tbpB* de 2139 pb, la secuencia intergénica de 87 pb y los 483 primeros nucleótidos de la secuencia codificante de *tbpA* a partir del ADN genómico de *Neisseria meningitidis* serogrupo B usando los oligonucleótidos **BAD16** (5'- GGC CTA GCT AGC CGT CTG AAG CGA TTA GAG TTT CAA AAT TTA TTC-3') y **BAD17** (5'-GGC CAA GCT TCC GAC GGC GTT CGA CCG AGT TTG AGC CTT TGC-3') que contienen secuencias de captación y sitios de restricción *NheI* y *HindIII* (subrayados). Este fragmento de PCR se limpió con un kit High Pure (Boehringer Mannheim, Alemania) y se clonó directamente en un vector pGemT (Promega, EEUU). Este plásmido se sometió a mutagénesis por PCR circular (Jones y Winistofer (1992)) para (i) insertar sitios de restricción adecuados que permitan la clonación de un casete promotor CmR/*PorA* y (ii) delecionar 209 pb de la secuencia flanqueante 5' de *tbpB* y la secuencia codificante de *tbpB*. La PCR circular se realizó usando los oligonucleótidos **BAD 18** (5'-TCC CCC GGG AAG ATC TGG ACG AAA AAT CTC AAG AAA CCG-3') y **BAD 19** (5'-
 15 GGA AGA TCT CCG CTC GAG CAA ATT TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGC AAC AGC AAC ATT TGT TCC G -3') que contienen sitios de restricción adecuados *XmaI*, *BglII* y *XhoI* (subrayados). El casete promotor CmR/*PorA* se amplificó a partir del plásmidos pUC D15/Omp85 descrito previamente, usando los cebadores **BAD21** (5'- GGA AGA TCT CCG CTC GAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3') y **BAD20** (5'- TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3') que contienen sitios de restricción adecuados *XmaI*, *SpeI*, *BglII* y *XhoI* (subrayados). Este fragmento de PCR se clonó en el plásmido de PCR circular. Este plásmido se usará para transformar *Neisseria meningitidis* serogrupo B (*cps*-) y cepas [*cps*- *porA*-]. La integración por doble cruce en la región cadena arriba de *tbpA* dirigirá la integración del promotor *porA* directamente cadena arriba del ATG de *tbpA*.

Ejemplo 4: Construcción de una cepa de *N. meningitidis* serogrupo B regulada positivamente para la expresión de dos antígenos: TbpA y Hsf.

El objetivo del experimento fue regular positivamente la expresión de TbpA y Hsf, simultáneamente en la misma cepa de *N. meningitidis* serogrupo B. La producción de TbpA se reguló positivamente reemplazando su región promotora endógena por el promotor *porA* fuerte (reemplazo de promotor). En este contexto, el gen *tbpB*, localizado cadena arriba de *tbpA* se deleciona, y la proteína TbpB deja de estar presente en la membrana externa. La expresión de Hsf se reguló positivamente por inserción (recombinación homóloga) de una segunda copia del gen correspondiente en el locus *porA* (suministro génico). Ambas cepas se han descrito en una patente diferente mencionada como documento WO01/09350. Los marcadores de selección usados en ambas estrategias (Cm^R o Kan^R) permitieron la combinación de ambas integraciones en el mismo cromosoma.

Se extrajo el ADN genómico total de la cepa recombinante *Nm.B cps*-/*TbpA*+/*PorA*+ por el protocolo Qiagen Genomic tip 500-G. Se restringieron diez µg de ADN durante una noche con la enzima de restricción *DraIII* y se usó para transformar *Neisseria meningitidis* serogrupo B por el protocolo de transformación clásico. Las células usadas para la transformación fueron recombinantes *NmB cps*-/*Hsf*+/*PorA*+ (recombinación homóloga por 1 cruce en el locus *porA*) o recombinantes *NmBcps*-/*Hsf*+/*PorA*- (intercambio alélico/recombinación homóloga por 2 cruces en el locus *porA*). Se sembraron en placa durante una noche en agar GC que contenía 200 µg/ml kanamicina, diluido a D_{0.650}= 0,1 en medio líquido GC MgCl₂ 10 mM, y se incubaron 6 horas a 37°C en agitación vigorosa con 10 µg de ADN genómico restringido con *DraIII*. Se seleccionaron *Neisseria meningitidis* recombinantes resultantes de un acontecimiento de doble cruce (exploración por PCR) en medio GC que contenía 200 µg/ml de kanamicina y 5 µg/ml de cloranfenicol y se analizaron para la expresión de TbpA y Hsf en preparaciones de VME. Como se representan en la Figura 1, la producción tanto de TbpA como de Hsf estuvo significativamente aumentada en la VME preparada a partir de la cepa *NmB TbpA*/*Hsf* recombinante en comparación con la VME preparada a partir de las cepas de control *NmB cps*-. El nivel de sobre-expresión de cada proteína en el recombinante dual es comparable con el nivel de expresión obtenido en los recombinantes sencillos correspondientes. El nivel de sobre-expresión de TbpA y Hsf fue comparable en cepas *PorA*+ y *PorA*- (datos no mostrados). Todos en conjunto, estos datos demuestran que: (i) la expresión de TbpA y Hsf puede regularse positivamente de forma conjunta y concomitante en *N. meningitidis* y (ii) pueden obtenerse ampolla recombinante enriquecidas para TbpA y Hsf y usarse para inmunización.

55

Ejemplo 5: Construcción de una cepa de *N. meningitidis* serogrupo B regulada positivamente para la expresión de dos antígenos: TbpA y NspA.

El objetivo del experimento fue regular positivamente la expresión de TbpA y NspA simultáneamente en la misma cepa de *N. meningitidis* serogrupo B. La producción de TbpA se reguló positivamente reemplazando su región promotora endógena por el promotor *porA* fuerte (reemplazo de promotor). La expresión de NspA se reguló positivamente por inserción (recombinación homóloga) de una segunda copia del gen correspondiente al locus *porA* (suministro génico). Ambas cepas individuales se han descrito en una patente diferente documento WO01/09350. Los marcadores de selección usados en ambas estrategias (Cm^R o Kan^R) permitieron la combinación de ambas integraciones en el mismo cromosoma.

Se extrajo el ADN genómico total de la cepa recombinante *NmB cps-/TbpA+/PorA+* por el protocolo Qiagen Genomic tip 500-G. Se restringieron diez µg de ADN durante una noche con la enzima de restricción *AatII* y se usaron para transformar *Neisseria meningitidis* serogrupo B por el protocolo de transformación clásico. Las células usadas para la transformación fueron recombinantes *NmB cps-/NspA+/PorA-*. Se sembraron en placa durante una noche en agar GC que contenía 200 µg/ml de kanamicina, diluido a DO₆₅₀ = 0,1 en medio líquido GC MgCl₂ 10 mM, y se incubaron 6 horas a 37°C en agitación vigorosa con 10 µg de ADN genómico restringido con *AatII*. Se seleccionaron *Neisseria meningitidis* recombinantes resultantes de un acontecimiento de doble cruce (exploración por PCR) en medio GC que contenía 200 µg/ml de kanamicina y 5 µg/ml de cloranfenicol y se analizaron para la expresión de TbpA y NspA en preparaciones de VME. La producción tanto de TbpA como de NspA estuvo significativamente aumentada en la VME preparada a partir de la cepa *NmB TbpA/NspA* recombinante en comparación con la VME preparada a partir de las cepas de control *NmB cps-*. El nivel de sobre-expresión de cada proteína en el recombinante dual es comparable con el nivel de expresión obtenido en los recombinantes sencillos correspondientes. Todos en conjunto, estos datos demuestran que: (i) la expresión de TbpA y NspA puede regularse positivamente de forma conjunta y concomitante en *N. meningitidis* y (ii) pueden obtenerse ampollas recombinantes enriquecidas para TbpA y NspA y usarse para inmunización.

Ejemplo 6: Construcción de una cepa de *N. meningitidis* serogrupo B regulada positivamente para la expresión de dos antígenos: NspA y D15/Omp85.

El objetivo del experimento fue regular positivamente la expresión de NspA y D15/Omp85 simultáneamente en la misma cepa de *N. meningitidis* serogrupo B. La producción de D15/Omp85 se reguló positivamente reemplazando su región promotora endógena por el promotor *porA* fuerte (reemplazo de promotor). La expresión de NspA se reguló positivamente por inserción (recombinación homóloga) de una segunda copia del gen correspondiente en el locus *porA* (suministro génico). Ambas cepas se han descrito en una patente diferente documento WO01/09350. Los marcadores de selección usados en ambas estrategias (Cm^R o Kan^R) permitieron la combinación de ambas integraciones en el mismo cromosoma.

Se extrajo el ADN genómico total de la cepa recombinante *NmB cps-/D15-Omp85/PorA+* por el protocolo Qiagen Genomic tip 500-G. Se restringieron diez µg de ADN durante una noche con la enzima de restricción *AatII* y se usaron para transformar *Neisseria meningitidis* serogrupo B por el protocolo de transformación clásico. Las células usadas para la transformación fueron recombinantes *NmB cps-/NspA+/PorA-*. Se sembraron en placa durante una noche en agar GC que contenía 200 µg/ml de kanamicina, diluido a DO₆₅₀ = 0,1 en medio líquido GC MgCl₂ 10 mM, y se incubaron 6 horas a 37°C en agitación vigorosa con 10 µg de ADN genómico restringido con *AatII*. Se seleccionaron *Neisseria meningitidis* recombinantes resultantes de un acontecimiento de doble cruce (exploración por PCR) en medio GC que contenía 200 µg/ml de kanamicina y 5 µg/ml de cloranfenicol y se analizaron para la expresión de NspA y D15/Omp85 en preparaciones de VME. La producción tanto de NspA como de D15/Omp85 estuvo significativamente aumentada en la VME preparada a partir de la cepa *NmB NspA/D15-Omp85* recombinante en comparación con la VME preparada a partir de las cepas de control *NmB cps-*. El nivel de sobre-expresión de cada proteína en el recombinante dual es comparable con el nivel de expresión obtenido en los recombinantes sencillos correspondientes. Todos en conjunto, estos datos demuestran que: (i) la expresión de NspA y Omp85 puede regularse positivamente de forma conjunta y concomitante en *N. meningitidis* y (ii) pueden obtenerse ampollas recombinantes enriquecidas para NspA y Omp85 y usarse para inmunización.

Ejemplo 7: Producción y purificación de formas Hsf recombinantes en *E. coli*.

El análisis informático de la proteína tipo Hsf de *Neisseria meningitidis* revela al menos cuatro dominios estructurales. Considerando la secuencia de Hsf de la cepa H44/76 como referencia, el Dominio 1, que comprende los aminoácidos 1 a 51, codifica un péptido señal dependiente de sec característico de la familia de autotransportadores, el Dominio 2, que comprende los aminoácidos 52 a 473, codifica el dominio pasajero probablemente para estar expuesto en superficie y accesible al sistema inmune, el Dominio 3, que comprende los aminoácidos 474 a 534, codifica un dominio super-enrollado putativo necesario para la oligomerización de la proteína y una bisagra (cuello), el Dominio 4, que comprende los restos 535 al extremo C-terminal, se predice que codifica cadenas beta probablemente para ensamblarse en una estructura tipo barril y para anclarse en la membrana externa (Henderson y col. (1998), Trends Microbiol. 6: 370-378; Hoiczky y col. (2000), EMBO 22: 5989-5999). Como los dominios 2 y 3 son probablemente para exponerse en superficie, están bien conservados (más del 80% en todas las cepas ensayadas; como se describe en Pizza y col. (2000), Science 287: 1816-1820), representan

interesantes candidatos de vacuna. Para ese propósito, el dominio 2 (mencionado como dominio pasajero de Hsf) y el dominio 2 + 3 (mencionado como dominio de cuello + super-enrollado de Hsf) se expresaron en y se purificaron de *E. coli*. Los fragmentos de ADN que codifican los aminoácidos 52-473 (pasajero de Hsf) y 52-534 (n+cc de Hsf) se amplificaron por PCR usando oligonucleótidos que añaden sitios de restricción terminales *RcaI* (cebador directo) y *XhoI* (cebador inverso). Se digirieron los amplicones purificados con *RcaI/XhoI* en las condiciones recomendadas por el proveedor, y se clonaron posteriormente en los sitios *NcoI* (compatible con *rcaI*) / *XhoI* del vector de expresión en *E. coli* pET24d (Novagen Inc., Madison WI). Los plásmidos recombinantes se seleccionaron y usaron para preparar plásmidos recombinantes purificados. Para el estudio de expresión, estos vectores (pET-Hsf pas y pET-Hsf ncc) se introdujeron en la cepa de *Escherichia coli* BL21DE3 (Novagen), en la cual, el gen para la polimerasa T7 está situado bajo el control del promotor *lac* regulable por isopropil-beta-D tiogalactósido (IPTG). Se cultivaron cultivos líquidos (700 ml) de la cepa de *E. coli* recombinante Novablue (DE3) [pET-24bBASB029] a 37°C en agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm (DO600) alcanzó 0,6. En ese momento puntual, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y el cultivo se cultivó durante 4 horas adicionales. El cultivo después se centrifugó a 10.000 rpm y el sedimento se congeló a - 20°C durante al menos 10 horas. Después de descongelar, el sedimento (680 ml de cultivo) se resuspendió durante 30 minutos a 22°C en tampón fosfato 20 mM pH 7,0 antes de la lisis celular por dos pases a través de un disruptor Rannie. Las células lisadas se sedimentaron 30 min. a 15.000 rpm (centrífuga Beckman J2-HS, rotor JA-20) a 4°C. El sobrenadante se cargó en una columna de flujo rápido de Q-Sepharose (Pharmacia) equilibrada en tampón Tris-HCl 20 mM pH, 8,0. Después del paso del flujo continuo, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón Tris-HCl 20 mM pH 8,0. La proteína recombinante se eluyó de la columna por NaCl 250 mM en tampón Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Las fracciones positivas a antígeno se combinaron y se dializaron durante una noche frente a tampón fosfato 20 mM pH 7,0, y se añadieron NaCl 0,5 M e imidazol 20 mM a la muestra dializada. Después la muestra se aplicó a columna de Ni-NTA Agarosa (Qiagen) equilibrada en tampón fosfato 20 mM pH 7,0 que contenía NaCl 500 mM e imidazol 20 mM. Después del paso del flujo continuo, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón fosfato 20 mM pH 7,0 que contenía NaCl 500 mM e imidazol 20 mM. Los contaminantes se eluyeron por imidazol 100 mM en tampón fosfato 20 mM pH 7,0. La proteína recombinante se eluyó de la columna por imidazol 250 mM en tampón fosfato 20 mM pH 7,0. Las fracciones positivas a antígeno se combinaron y se dializaron frente a tampón fosfato 10 mM pH 6,8 que contenía NaCl 150 mM. Como se muestra en la figura 2, se eluyó una proteína pasajera tipo Hsf enriquecida (pureza estimada a más del 90% pura en SDS-PAGE teñido con CBB), que migraba a aproximadamente 47 kDa (masa molecular relativa estimada), de la columna. Este polipéptido era reactivo contra un anticuerpo monoclonal de ratón creado contra el motivo 5-histidina. Tomados en conjunto, estos datos indican que tanto el gen del pasajero de Hsf como el de ncc de Hsf pueden expresarse y purificarse en una forma recombinante en *E. coli*.

Ejemplo 8: Producción y purificación de pasajero de Hap recombinante en *E. coli*

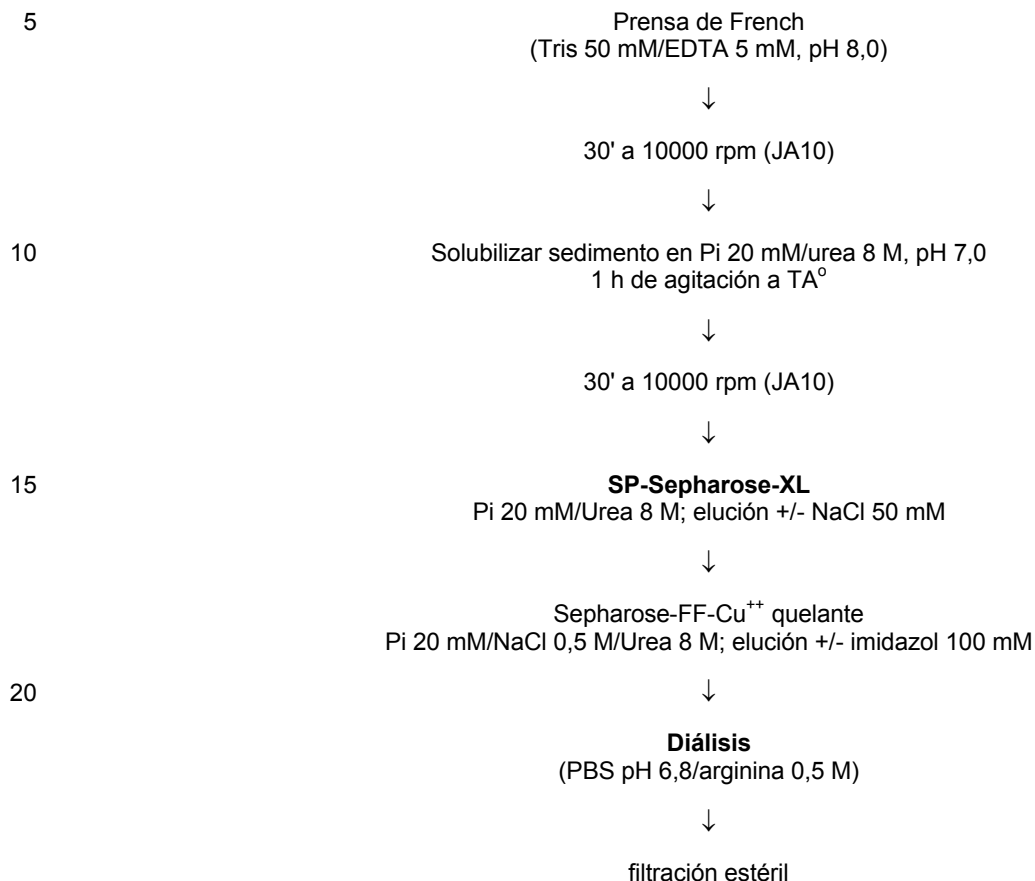
El análisis informático de la proteína tipo Hap de *Neisseria meningitidis* revela al menos tres dominios estructurales. Considerando la secuencia tipo Hap de la cepa H44/76 como referencia, el Dominio 1, que comprende los aminoácidos 1 a 42, codifica un péptido señal dependiente de sec característico de la familia de autotransportadores, el Dominio 2, que comprende los aminoácidos 43 a 950, codifica el dominio pasajero probablemente para estar expuesto en superficie y accesible al sistema inmune, el Dominio 3, que comprende los restos 951 hasta el extremo C-terminal (1457), se predice que codifica cadenas beta probablemente para ensamblarse en una estructura tipo barril y para anclarse en la membrana externa. Como el dominio 2 es probablemente para exponerse en superficie, está bien conservado (más del 80% en todas las cepas ensayadas) y podría producirse como antígenos de subunidad en *E. coli*, representa interesantes candidatos de vacuna. Como los dominios 2 y 3 son probablemente para exponerse en superficie, están bien conservados (más del 80% en todas las cepas ensayadas; como se describe en Pizza y col. (2000), Science 287: 1816-1820), representan interesantes candidatos de vacuna. Para ese propósito, el dominio 2 (mencionado como dominio pasajero de Hap) se expresó en y se purificó de *E. coli*. Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que codificaba los aminoácidos 43-950 (pasajero de Hap) usando oligonucleótidos que añaden sitios de restricción terminales *NcoI* (cebador directo) y *XhoI* (cebador inverso). Se digirieron los amplicones purificados con *NcoI/XhoI* en las condiciones recomendadas por el proveedor, y se clonaron posteriormente en los sitios *NcoI* / *XhoI* del vector de expresión en *E. coli* pET24d (Novagen Inc., Madison WI). Los plásmidos recombinantes se seleccionaron y se purificaron a gran escala. Para el estudio de expresión, estos vectores (pET-Hap pas.) se introdujeron en la cepa de *Escherichia coli* BL21DE3 (Novagen), en la cual, el gen para la polimerasa T7 está situado bajo el control del promotor *lac* regulable por isopropil-beta-D tiogalactósido (IPTG).

Cultivo de *E. coli* BL21[pET-Hap pas.] en fermentador: Se extendió una fracción de alícuota (100 µl) de la semilla maestra en placas FEC013AA (peptona de soja A3 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l, Agar 18 g/l, H₂O destilada hasta 1 l) y se cultivó 20 horas a 37°C. El césped bacteriano se recogió y resuspendió en agua estéril que contenía NaCl al 0,9%. Esta solución se usó para inocular un fermentador de 20 l usado en modo discontinuo en medio FEC011AC (peptona de soja 24 g/l, extracto de levadura 48 g/l, MgSO₄/7H₂O 0,5 g/l, K₂HPO₄ 2 g/l, NaH₂PO₄/2H₂O 0,45 g/l, glicerol (87%) 40 g y H₂O destilada hasta 1 l). Se mantuvieron la temperatura (30°C), el pH (6,8, NaOH al 25% /H₃PO₄ al 25%), la presión (500 mbar), constantes y la aireación se estableció a 20 l/min. En estas condiciones la presión de oxígeno disuelto se mantuvo al 20% ajustando la agitación (100 a 1000 rpm). Se añadió el inductor (IPTG, 1 mM) después de 8 horas de cultivo (DO = 27,8). Las muestras (6 l) se recogieron después de 6 horas (DO = 49,2) y 16 h 30 (DO = 48,6), se recogió la biomasa por centrifugación y se almacenaron

los sedimentos correspondientes a -20°C.

Purificación de pasajero de Hap:

El pasajero de HAP se purificó de un fermentador en modo discontinuo. Se desarrolló un esquema de purificación (véase a continuación).



La mayoría del pasajero de Hap se recupera en el sedimento de centrifugación tras la rotura celular. La solubilización se hizo posible por urea 8 M. A pesar de la cola His N-term, la CAMI no fue operativa como primera etapa, pero sí tras una primera etapa en intercambiador de cationes SP-XL. En esta SP-Sepharose-XL, la proteína se eluye cuantitativamente en el centro de un gradiente lineal de NaCl (0-250 mM). La CAMI se hizo con Sepharose FF quelante cargada con Cu⁺⁺, como para FHAb. Esta vez, al contrario que con FHAb, la CAMI muestra un factor de purificación significativo. En SDS-PAGE, HAP2/3 parece puro después de CAMI. El pico de HAP2/3 fue, sin embargo, muy ancho en gradiente de imidazol 0-200 mM, de modo que se intentó por etapas de imidazol (10 mM-100 mM); el modo de gradiente parece, sin embargo, más eficaz en términos de pureza. Como etapa final, se intentó el intercambio de tampón urea-a-arginina por exclusión molecular, sin embargo, en este caso la proteína eluyó en dos picos. Estos dos picos muestran un perfil comparable en SDS-PAGE; de modo que puede hipotetizarse que se debe a un repliegamiento parcial del pasajero de HAP. Entonces se regresó a la diálisis clásica como etapa final para el intercambio de tampón. El análisis por SDS-PAGE muestra buena pureza del material final (véase en la figura 3). La pureza del pasajero de HAP se confirma adicionalmente por TW anti-his. Se reconoce por anti-*E. coli*. Se halla un peso molecular de 96,1 KD.

Ejemplo 9: Producción y purificación de formas FrpA/C recombinantes en *E. coli*

Neisseria meningitidis codifica dos proteínas RTX, mencionadas como FrpA y FrpC secretadas tras limitación de hierro (Thompson y col., (1993) J. Bacteriol. 175:811-818; Thompson y col., (1993) Infect. Immun. 61:2906-2911). La familia de proteínas RTX (Repeticiones en ToXina) tiene en común una serie de repeticiones de 9 aminoácidos cerca sus extremos C-terminales con el consenso: Leu Xaa Gly Gly Xaa Gly (Asn/Asp) Asp Xaa. (LXGGXGN₁₀DX). Se cree que las repeticiones en HlyA de *E. coli* son el sitio de unión a Ca²⁺. Como se representa en la Figura 4, las proteínas de meningococos FrpA y FrpC, caracterizadas en la cepa FAM20, comparte similitud extensiva de aminoácidos en sus regiones central y C-terminal pero similitud muy limitada (si la hay) a el extremo N-terminal. Además, la región conservada entre FrpA y FrpC muestra algún polimorfismo debido a repetición (13 veces en FrpA y 43 veces en FrpC) de un motivo de 9 aminoácidos. Para evaluar el potencial de vacuna de FrpA y FrpC, se produjeron de forma recombinante en *E. coli* las regiones proteicas conservadas entre FrpA y FrpC. Para ese

propósito, se amplificó por PCR un segmento de ADN que cubre los aminoácidos 277 a 1007 (con respecto a la secuencia del péptido FAM20 de *N. meningitidis*) a partir del genoma de H44/76 de *N. meningitidis* serogrupo B usando el cebador directo FrpA-19 (5'-CTCGAGACCATGGGCAAA TATCATGTCTACGACCCCTCGC-3') y el cebador inverso FrpA-18 (3'-GTG CATAGTGTGAGATTTTTGTGACGTCG-TAATTATAGACC-3'). Se obtuvieron tres amplicones de respectivamente ~1530 pb (3 repeticiones), ~2130 pb (13 repeticiones) y 2732 pb (23 repeticiones) y se digirieron con las endonucleasas de restricción *NcoI* y *SalI*. Estos fragmentos después se insertaron en los sitios *NcoI/XhoI* (compatible con *SalI*) de pET24d y se seleccionaron plásmidos recombinantes (pET-Frp3, pET-Frp13 y pET-Frp23 respectivamente) y se usaron para transformar células BL21DE3 de *E. coli*. Como se representa en la figura 5, las tres construcciones produjeron dominios conservados FrpA/C recombinantes tras inducción. Además, el aumento de la cantidad de repeticiones aumentó la solubilidad de la proteína recombinante, determinada por análisis de fraccionamiento celular (datos no mostrados).

Purificación del dominio conservado FrpA/C que contiene 23 repeticiones del nonapéptido LXGGXGN/DDX (911 aa en total): se cultivaron 3,5 litros de *E. coli* BL21DE3[pET-Frp23] y se indujeron durante 4 horas por la adición de IPTG 2 mM cuando la DO alcanzó 0,6. Las células se recogieron por centrifugación y el sedimento correspondiente se alteró por presión, se aclaró por centrifugación y el sobrenadante correspondiente se cargó en una columna de afinidad por iones metálicos de Ni²⁺ (Ni-NTA-agarosa, Qiagen GmbH). Se usó imidazol para la elución y se retiró finalmente por diálisis extensiva frente a Na fosfato 10 mM pH 6,8, NaCl 150 mM.

Ejemplo 10: Producción y purificación de formas FHA recombinantes en *E. coli*

Clonación de FhaB truncada de *N. meningitidis*

Se extrajo el ADN genómico de 10¹⁰ células de *N. meningitidis* serogrupo B cepa H44/76 usando el kit de extracción de ADN genómico de QIAGEN (Qiagen GmbH). Este material (1 µg) después se sometió a amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa usando los siguientes cebadores específicos para el gen FhaB: JKP: 5'AAT GGA ATA CAT ATG AAT AAA GGT TTA CAT CGC ATT ATC3' y 57JKP 5'CCA ACT AGT GTT TTT CGC TAC TTG GAG CTG T3'. Se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 4200 pb, que codifica los primeros 1433 aminoácidos N-terminales de la proteína, se digirió por las endonucleasas de restricción *NdeI/Spel* y se insertó en los sitios correspondientes del pMG MCS (pMG derivado, Proc Natl Acad Sci U S A 1985 Ene; 82(1):88-92) usando técnicas de biología molecular convencionales (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Segunda Edición, Eds: Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989). La secuencia de ADN del fragmento FhaB clonado se determinó usando el kit de secuenciación Big Dye Cycle (Perkin-Elmer) y un secuenciador de ADN ABI 373A/PRISM (véase la fig. 1). El plásmido pMG-FhaB recombinante (1 µg) después se sometió a amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos para FhaB (XJKP03 5'AATGGAATACATATGAATAAAGGTTTAC ATCGCATTATCTTTAG3' y XJKP5702 5'GGGGCCACTCGAGGTTTT TCGCTACTTGGAGCTGTTTCAG ATAGG3'). Se obtuvo un fragmento de ADN de 4214 pb, se digirió por las endonucleasas de restricción *NdeI/XhoI* y se insertó en los sitios correspondientes del vector de clonación/expresión pET-24b (Novagen) usando técnicas de biología molecular convencionales (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Segunda Edición, Eds: Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989). La secuenciación confirmatoria del pET-24b recombinante que contiene FhaB truncada (pET24b/FhaB2/3) se realizó usando el kit Big Dyes (Applied biosystems) y análisis en un secuenciador de ADN ABI 373/A en las condiciones descritas por el proveedor. La secuencia de nucleótidos resultante se presenta en la Figura 6.

Expresión y purificación de proteína FhaB truncada recombinante en *Escherichia coli*.

La construcción del vector de clonación/expresión pET24b/FhaB2/3 se describió anteriormente. Este vector alberga el gen FhaB truncado aislado de la cepa H44/76 en fusión con un tramo de los 6 restos de histidina (en el extremo C-terminal del producto recombinante), situado bajo el control del promotor fuerte del gen 10 del bacteriófago T7. Para el estudio de expresión, este vector se introdujo en la cepa de *Escherichia coli* Novablue (DE3) (Novagen), en la cual, el gene para la polimerasa T7 está situado bajo el control del promotor *lac* regulable por isopropil-beta-D tiogalactósido (IPTG). Los cultivos líquidos (100 ml) de la cepa recombinante Novablue (DE3) [pET24b/FhaB2/3] de *E. coli* se cultivaron a 37°C en agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm (DO 600) alcanzó 0,6. En ese momento puntual, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y el cultivo se cultivó durante 4 horas adicionales. El cultivo después se centrifugó a 10.000 rpm y el sedimento se congeló a -20°C durante al menos 10 horas. Después de descongelar, el sedimento se resuspendió durante 30 min. a 25°C en tampón A (clorhidrato de guanidina 6 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M, pH 8,0), se pasó tres veces a través de una aguja y se aclaró por centrifugación (20000 rpm, 15 min.). La muestra después se cargó a un caudal de 1 ml/min en una columna Hitrap cargada con Ni²⁺ (Pharmacia Biotech). Después del paso del flujo continuo, la columna se lavó sucesivamente con 40 ml de tampón B (urea 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M, pH 8,0), 40 ml de tampón C (urea 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M, pH 6,3). La proteína recombinante FhaB2/3/His6 después se eluyó de la columna con 30 ml de tampón D (urea 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M, pH 6,3) que contenía 500 mM de imidazol y se recogieron fracciones de 3 ml de tamaño. Como se presenta en la figura 7, se eluyó una proteína FhaB-2/3/His6 altamente enriquecida, que migraba a aproximadamente 154 kDa (masa molecular relativa estimada), de la columna. Este polipéptido era reactivo contra un anticuerpo monoclonal de ratón creado contra el motivo 5-histidina. Tomados en conjunto, estos datos indican que FhaB2/3 puede expresarse y purificarse en una forma recombinante en *E. coli*.

Inmunización de ratones con FhaB2/3/His recombinante

Se inyectó la proteína FhaB2/3/His6 recombinante parcialmente purificada expresada en *E. coli* tres veces en ratones Balb/C en los días 0, 14 y 29 (10 animales/grupo). Los animales se inyectaron por vía subcutánea con aproximadamente 5 µg de antígeno en dos formulaciones diferentes: adsorbido en 100 µg de AlPO₄ o formulado en emulsión SBAS2 (emulsión SB62 que contiene 5 µg de MPL y 5 µg de QS21 por dosis). También se ha añadido un grupo de control negativo que consta de ratones inmunizados con la emulsión SBAS2 solamente en el experimento. Los ratones se exanguinaron en los días 29 (15 días Post II) y 35 (6 días Post III) para detectar anticuerpos anti-FhaB específicos. Los anticuerpos anti-FhaB específicos se midieron en sueros combinados (de 10 ratones/grupo) por ELISA sobre FhaB2/3/His recombinante purificada.

10 Ejemplo 11: Actividades de bloqueo de adhesión de sueros de ratón y conejo creados contra los antígenos FHA, Hap y Hsf

Se ha descrito previamente que proteínas homólogas a las de meningococos tipo FHAB, tipo Hsf y tipo Hap son importantes determinantes de virulencia y median la adhesión bacteriana de *Bordetella pertussis* (FHA) y *Haemophilus influenza* (Hap y Hsf). Se sabe que la adhesión a células epiteliales y endotelial es crucial para la colonización de la nasofaringe y el cruce de la barrera hemato-encefálica por los meningococos. Por tanto interferir con la adhesión de *N. meningitidis* representa un enfoque valioso para controlar la colonización e infección por meningococos. Aquí se ensayó si antisueros dirigidos contra los antígenos de meningococos FHAB 2/3^o, tipo Hap y tipo Hsf eran capaces de interferir con la adhesión de *Neisseria meningitidis* a las células endoteliales. Se usó el siguiente procedimiento experimental:

20 Inhibición de la adhesión a HUVEC: la cepa de ensayo de meningococos usada en este estudio fue un derivado sin cápsula, si pili, Opa- y Opc- de la cepa NmA8013. Las células de meningococos (2,10E5 unidades formadoras de colonias (UFC) del derivado NmA8013) se incubaron durante 30 minutos a 37°C en un medio compuesto de 400 µl de RPMI, 50 µl de suero bovino fetal y 50 µl del suero a ensayar para las propiedades de bloqueo de la adhesión. Esta mezcla después se colocó en un pocillo que contenía monocapas confluyentes de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) cuyo medio de cultivo se había retirado previamente. Las bacterias y las células HUVEC se incubaron durante 4 horas a 37°C, en CO₂ al 5%. Las monocapas celulares después se lavaron tres veces con suero RPMI fresco y posteriormente se desecharon de la placa. Las UFC asociadas a las células HUVEC se determinaron después por dilución seriada y siembra del lisado celular en placas GC. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C para permitir la recuperación y crecimiento de los meningococos asociados a células.

30 Actividades de bloqueo de la adhesión de sueros de ratón y conejo creados contra antígenos FHAB2/3^o recombinante, Hap y hsf: anticuerpos anti-FHA 2/3, anti-Hsf de longitud completa (descrito en el documento WO99/58683) y anti-Hap de longitud completa (documento WO99/55873), así como anti-sueros dirigidos contra los dominios pasajero correspondientes de Hsf y Hap, interfieren con la adhesión de meningococos a células HUVEC endoteliales. La Figura 8 ilustra que anticuerpos específicos inducidos por FHA 2/3 formulados en AlPO₄ eran capaces de inhibir la adhesión de *Neisseria meningitidis B* a las células HUVEC en comparación con el adyuvante solamente. Cuando se compara con el adyuvante SBAS2 solamente (sin antígeno, grupo 4), los ab anti-FHA 2/3 (formulación SBAS2) aún son eficaces, pero menos potentes que AlPO₄. El adyuvante SBAS2 solamente (sin antígeno) no induce anticuerpos capaces de interferir con la adhesión. En comparación con el grupo 4, anticuerpos anti-Hap (grupo 1) pueden tener un ligero efecto de inhibición. En el grupo 5; cuando se ensaya una mezcla de anticuerpos anti-FHA 2/3, anti-Hsf y anti-Hap, la inhibición de la adhesión es más fuerte que con anti-FHA 2/3 solamente, lo que sugiere un efecto sinérgico dando por los anticuerpos anti-Hap y anti-Hsf. En un segundo experimento de inhibición (Fig. 2), un antisuero de conejo específico dirigido contra anti VME que sobre-expresan Hsf (como proteína candidata) era capaz de inhibir parcialmente la fijación de *Neisseria meningitidis B* a las células endoteliales en comparación con el control negativo (grupo 3 frente a 4). Este antisuero de conejo ha demostrado contener un título de anticuerpo anti-Hsf específico muy elevado. Anticuerpos contra Hsf rec (pasajero de Hsf y Hsf de longitud completa) también son capaces de inhibir la adhesión de bacterias en las células HUVEC. Esto es cierto tanto con sueros de ratones (grupos 5 - 6) así como con sueros de conejo (en un menor grado) (grupo 7 - 8). En este segundo experimento, anticuerpos anti-FHA 2/3 rec específicos (grupo 1) ya ensayados en el primer experimento confirman su efecto inhibidor muy elevado. Estos resultados indican que estos antígenos específicos (Hap, FHA2/3 y Hsf), aislados o en combinación, son antígenos de vacuna interesantes.

Ejemplo 12: Efecto protector de VME recombinantes en el modelo de exposición de ratón

Se han evaluado varias VME recombinantes en ratones Balb/C para su efecto protector después de exposición letal. Este modelo de inmunización activa implicaba inyección intraperitoneal de meningococos de varias cepas (suspendidas en medio TSB de hierro agotado) en ratones adultos Balb/C u OF1 (6 - 8 semanas de edad), después de una serie de inmunización por vía subcutánea. El dextrano de hierro, usado como fuente externa de hierro parece ser necesario para mantener la bacteremia e inducir mortalidad en el animal infectado. Aunque este modelo IP en ratones ha demostrado ser eficaz para evaluar la virulencia, la protección inmune y el papel del hierro en infección, no incorpora la fase de transporte faríngeo, que precede a la bacteremia y la meningitis en seres humanos. Este modelo se ha usado para explorar los varios candidatos de VME que sobre-expresan NspA, TbpA, o Hsf. En los siguientes experimentos, se inmunizaron ratones Balb/C (endogámicos) u OF1 (exogámicos) tres veces en los días

0, 14 y 28 por vía subcutánea con 3 (PV00N049) a 5 µg (experimentos PV00N035 y PV00N043) para VME rec. que sobre-expresa Hsf, NspA o TbpA formulada en Al(OH)₃ (100 µg de Al(OH)₃/animal) (PV00N035 y PV00N043) o en AlPO₄ (100 µg de AlPO₄/animal). Después, se exanguina a los animales en los días 28 (día 14 tras II) y 35 (día 7 tras III) para la evaluación de Ab específicos. En el día 35, se inyectan 10 mg de dextrano de hierro por vía intraperitoneal una hora antes de la exposición. Las exposiciones se hicieron con cepas H44/76 (B:15:P1.7,16) o CU-385 (B:4:P1.19,15), con aproximadamente 1,10 e7 UFC/animal (véase la tabla de resultados para las dosis de exposición exactas). La cepa heteróloga hecha con la cepa CU-385 es más rigurosas que cuando se usa la cepa homóloga. Las mortalidades se registraron de los días 1 a 5. La tabla 1 a continuación en el presente documento ilustra que cuando se compara la VME porA (-) y con la VME porA (+) en un menor grado, ya existe una mejor protección observada con VME TbpA (+) (1/10 y 3/5 para porA(-) y 9/10 y 3/5 para porA (+)), con VME NspA (+) (4/10 y 4/5) y con VME Hsf (+) (3/10, 2/10 y 3/5). Esta es la observación global que puede hacerse en estos tres experimentos. Estos datos apoyan que los antígenos TbpA, Hsf y NspA, expresados en la superficie de ampolla, son de interés para una futura vacuna contra menB.

Tabla 1: Actividad protectora en el modelo de ratón de vesículas de membrana externa recombinantes. La tabla resume los resultados obtenidos durante tres experimentos (PV00N35, PV00N043 y PV00N049)

VME (ampollas)				
VME Rec (H44/76 fondo = porA P1.17, 16)	Tasa de supervivencia (en el día Protección activa en ratón			Ab inmunoespecíficos por Elisa Media - PV00N049 solamente
	PV00N035 en ratones OF1	PV00N043 en ratones Balb/c	PV00N049 en ratones OF1	
	Cepa de exposición (+			
	H44/76 (B:15:P1.7, 1.27)	H44/76 (8:15:P1.7, 1.0)	CU-385 (B:4:P1.19.1, 1.1)	
VME porA(-)	1/10	0/10	1/5	/
VME por A(+)	2/10	9/10	4/15	/
VME TbpA porA(+)	NT	9/10	3/5	<
VME TbpA porA (-)	NT	1/10	3/5	<
VME NspA porA (-)	1/10	4/10	4/5	155 - (<
VME Hsf PorA(-)	3/10	2/10	3/5	7802 - (5496)
VME Hsf Por A(+)	NT	9/9	NT	/
Sin antígeno	0/10	0/10	1/5	/

NT: No ensayado (not tested).

Ejemplo 13: Efecto protector de antígenos de subunidad recombinantes en el modelo de exposición de ratón

Se han evaluado varias proteínas purificadas recombinantes en ratones Balb/C para su efecto protector después de exposición letal. Este modelo de inmunización activa implicaba la inyección intraperitoneal de meningococos de varias cepas (suspendidas en medio TSB de hierro agotado) en ratones adultos Balb/C u OF1 (6 - 8 semanas de edad) después de una serie de inmunización por vía subcutánea.

El dextrano de hierro, usado como fuente externa de hierro parece ser necesario para mantener la bacteremia e inducir mortalidad en el animal infectado. Aunque este modelo IP en ratones ha demostrado ser eficaz para evaluar la virulencia, protección inmune y el papel del hierro en la infección, no incorpora la fase de transporte faríngeo, que precede a la bacteremia y la meningitis en seres humanos. Este modelo se ha usado para explorar varios candidatos de vacuna de subunidad contra menB como moléculas recombinantes FrpC, TbpA, FHA2/3 y Hap.

En este experimento, se inmunizaron ratones OF1 (exogámicos) tres veces en los días 0, 14 y 28 por vía subcutánea con 5 µg (PV00N050) de estas proteínas formuladas en AlPO₄ (100 µg) en presencia de 10 µg de MPL (por animal).

Después, los animales se exanguinaron en los días 28 (día 14 tras II) y 35 (día 7 tras III) para la evaluación de Ab específicos, aunque se exponen en el día 35. El día de la exposición, se inyectan 10 mg de dextrano de hierro por

vía intraperitoneal una hora antes de la exposición. Las exposiciones se hicieron con cepas CU-385 (B:4:P1.19,15), que son heterólogas en este caso, de hecho, la secuencia de antígenos que proviene de H44/76 (B:15:P1.7,16), excepto para TbpA para la cual la secuencia proviene de la cepa B16B6 (B:2a:P1.2).

5 Los resultados ilustrados en la tabla 2 indican que FrpC, TbpA, FHAB2/3°, Hap inducían protección significativa en este modelo: de 2 a 4 de los 5 ratones sobrevivieron después de la exposición, en comparación con solamente 1/5 con el adyuvante solamente. En todos los grupos salvo uno, el título de anticuerpo específico fue elevado (el título anti-TbpA específico fue moderado). Todos estos datos apoyan que FrpC, FrpA, el dominio conservado de FrpA/C, TbpA, FHAB2/3°, Hap presentados como antígenos de subunidad, aislados o en combinación, son de interés para el desarrollo de una vacuna contra menB.

10 **Tabla 2: Actividad protectora en el modelo de ratón de vesículas de membrana externa recombinantes.** La tabla resume los resultados obtenidos durante un experimento (PV00N050).

Antígenos de subunidad		
Antígenos de subunidad Rec (de la secuencia Ag H44/76)	Tasa de supervivencia (en el día 5) Modelo de protección activa en ratón	Ab inmunespecíficos por Elisa Media - (MGT)
	PV00N050 (en ratones OF1)	
	Cepa de exposición (+ dosis)	
	CU-385 (B:4:p1.19, 15) 1.4 10e7	
FrpC tratado con Ca2 ⁺⁺	3/5	31477 - (27068)
FHAB 2/3 replegado	2/5	98200 - (73220)
FHAB 2/3 no replegado	3/5	55939 - (35347)
Hap N-ter	4/5	9960 - (12811)
TbpA rec en SBAS4	3/5	875 - (520)
SBAS4	1/5	/

Ejemplo 14: Procedimiento para mostrar el efecto sinérgico de combinaciones de antígenos de vacuna.

15 Pueden ensayarse diferentes VME recombinantes disponibles (VME porA (+) rmp-LbpB, VME porA (-) TbpA (+) Hsf (+), VME porA (-) TbpA (+), VME porA (-) NspA (+), VME porA (-) Hsf (+), VME porA (-) TbpA (+) NspA (+)) solas o en combinación para determinar estadísticamente las mejores combinaciones, en términos de detección de un efecto sinérgico de dichas combinaciones de candidatos de vacuna. Este trabajo también puede realizarse con combinaciones de antígenos de subunidad, así como la combinación de antígenos de subunidad + VME recombinantes. Pueden inyectarse 32 grupos de 5 ratones OF1/grupo y ensayarse para la actividad sérica bactericida y opsonica, la protección activa y pasiva en el modelo de ratón (si fuera necesario usar cantidades subóptimas de antígenos individuales). Una indicación de combinaciones sinérgicas de antígenos es si el nivel de protección conferido después de la inmunización combinada es mayor que la suma de los antígenos individuales.

Ejemplo 15: Análisis del contenido de Hsf y TbpA de vesículas de membrana externa en SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie

25 Se diluyeron 1 5yg de proteína en preparaciones de vesícula de membrana externa con regulación positiva de Hsf o TbpA o tanto Hsf como TbpA, en un tampón de muestra que contenía β-mercaptoetanol y se calentaron a 95°C durante 10 minutos. Las muestras después se procesaron en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Novex Tris-glicina al 4-20% 1,5 mm SDS Page de pocillo 2D), teñido en azul de Coomassie durante una hora y destañido en varios lavados de destinción. Los resultados se muestran en la Figura 9, que muestra que el nivel de Hsf y TbpA son considerablemente mayores en preparaciones de vesícula de membrana externa, obtenida de *N. meningitidis* en que su nivel de expresión se había potenciado.

Ejemplo 16: Inmunogenicidad de VME con regulación positiva de Hsf y/o TbpA

35 Se inmunizaron grupos de 20 ratones tres veces con VME por vía intramuscular en los días 0, 21 y 28. Cada inoculación estaba compuesta por 5 µg (contenido de proteínas) de VME formuladas en AIPO4 con MPL. Las VME se obtuvieron de *N. meningitidis* cepa H44/76, modificada por ingeniería de moso que estuvieran regulados negativamente los polisacáridos capsulares y PorA. Se hizo una comparación de VME en que Hsf, TbpA, tanto Hsf como TbpA o ninguno estuviera regulado positivamente. En el día 41, se tomaron muestras de sangre para el

análisis por ELISA o por ensayo bactericida en suero.

ELISA para detectar anticuerpos contra Hsf

Se recubrieron microplacas de 96 pocillos (Nunc, Maxisorb) durante una noche a 4°C con 100 µl de 1 µg/ml de antígeno específico en PBS. Después de lavar con NaCl 150 mM Tween 20 al 0,05%, las placas se saturaron con 100 µl de PBS-BSA al 1% en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Entre cada etapa (realizada en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. y con PBS-BSA al 0,2% como tampón diluyente), los reactivos en exceso se retiraron por lavado con NaCl-Tween 20. Se añadieron cien microlitros de muestras de suero diluidas por micropocillo. Los anticuerpos unidos se reconocieron por un anticuerpo biotinilado anti-Ig de ratón (Prosan) (1/2000). El complejo antígeno-anticuerpo se reveló por incubación con conjugado estreptavidina-peroxidasa biotinilada (Amersham) (1/4000). Se usa ortofenilendiamina/H₂O₂ (4 mg/10 ml de tampón citrato 0,1 M pH 4,5 + 5 µl de H₂O₂) para revelar el ensayo. Las placas se incubaron durante 15 min. a temperatura ambiente en la oscuridad antes de detener la reacción por la adición de 50 µl de HCl 1 N. La absorbancia se leyó a 490 nm.

	Punto medio del título (en sueros combinados)
g1, ampollas TbpA-HSF, IM	15471
g2, ampollas TbpA, IM	15,41
g3, ampollas HSF, IM	14508
g4, ampollas CPS(-)PorA(-), IM	-
g5, MPUAIP04, IM	-

Los resultados mostrados en la tabla anterior, muestran que se creaban títulos de anticuerpo elevados y equivalentes contra Hsf por inmunización con VME con regulación positiva de Hsf o tanto Hsf como TbpA. No pudo detectarse casi ningún anticuerpo contra Hsf en sueros creados después de inoculación con adyuvante solo o VME en que no se había regulado positivamente ni Hsf ni TbpA o VME en que solamente se había regulado positivamente TbpA.

Ejemplo 17: Actividad bactericida en suero de sueros creados contra VME con regulación positiva de Hsf y/o TbpA

La actividad bactericida en suero de antisueros de ratones inoculados con VME con regulación positiva de Hsf, TbpA, tanto Hsf como TbpA o sin regulación positiva se comparó en ensayos usando la cepa homóloga H44/76 o la cepa heteróloga Cu385. El actividad bactericida en suero ha demostrado mostrar buena correlación con la protección y por lo tanto es una buena indicación de cómo de eficaz será una composición candidata para provocar una respuesta inmune protectora.

Se cultivaron cepas de tipo silvestre de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (cepa H44/76 = B:15.P1.7,16 L3,7,9 y cepa CU385 = B: 4 P1.19,15 L3,7,9) durante una noche en placas Petri con MH + Polyvitex al 1% + suero de caballo al 1% a 37°C + CO₂ al 5%. Se subcultivaron durante 3 horas en un medio TSB líquido suplementado con 50 µM de Desferal (quelante de hierro) a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 0,5 a 470 nm.

Se inactivaron sueros combinados o individuales durante 40 min. a 56°C. Las muestras séricas se diluyeron 1/100 en HBSS-BSA al 0,3% y después se diluyeron en serie de factor dos (8 diluciones) en un volumen de 50 µl en microplacas de fondo redondo.

Las bacterias, a la DO apropiada, se diluyeron en HBSS-BSA al 0,3% para producir 1,3 10⁴ UFC por ml. Se añadieron 37,5 µl de esta dilución a las diluciones de suero y se incubaron las microplacas durante 15 minutos a 37°C en agitación. Después, se añadieron 12,5 µl de complemento de conejo a cada pocillo. Después de 1 hora de incubación a 37°C y en agitación, las microplacas se colocaron en hielo para detener la eliminación.

Usando el procedimiento de inclinación, se sembraron 20 µl de cada pocillo en placas Petri con MH + Polyvitex al 1% + suero de caballo al 1% y se incubaron durante una noche a 37°C + CO₂. Se contaron las UFC y se calculó el porcentaje de eliminación. El título bactericida en suero es la última dilución que produce ≥ 50% de eliminación.

VME	H44/76		CU385		
	MGT	% respondedores	MGT	% respondedores	
CPS(-) PorA (-)		93	30%	58	5%
CPS(-) PorA (-) Hsf		158	40%	108	20%
CPS(-) PorA (-) TbpA		327	60%	147	30%
CPS(-) PorA (-) Hsf - TbpA		3355	100%	1174	80%

Se obtuvieron resultados similares a los mostrados en la tabla anterior en otros dos experimentos similares.

5 Se observó un drástico aumento en los títulos bactericidas (MGT) contra la cepa homóloga y una cepa heteróloga después de vacunación con VME en que tanto Hsf como TbpA estaban regulados positivamente. Por comparación, las MGT bactericidas medidas en ratones vacunados con VME de Hsf o TbpA regulado positivamente fueron similares a los obtenidos con ratones vacunados con VME de control.

El beneficio de la doble regulación positiva también se observó claramente en el porcentaje de ratones que producían un nivel significativo de anticuerpos bactericidas (títulos mayores de 1/100), particularmente en experimentos usando la cepa heteróloga.

Ejemplo 18: Efecto de mezclar sueros anti-Hsf y anti-TbpA sobre la actividad bactericida

10 Se inmunizaron grupos de 20 ratones tres veces con VME por vía intramuscular en los días 0, 21 y 28. Cada inoculación estaba compuesta por 5 µg (contenido de proteínas) de VME formuladas en AIPO4 con MPL. Las VME se obtuvieron de *N. meningitidis* cepa H44/76, modificada por ingeniería de modo que estuvieran regulados negativamente los polisacáridos capsulares y PorA. Se inmunizó un grupo de ratones con VME de control en que no había regulación positiva de proteínas. En un segundo grupo, la expresión de Hsf estaba regulada positivamente, en un tercer grupo la expresión de TbpA estaba regulada positivamente y en un cuarto grupo, estaba regulada positivamente tanto Hsf como TbpA.

Los sueros se combinaron, usando sueros de ratones en el mismo grupo o mezclando sueros aislados del grupo en los que Hsf solo o TbpA solo se había regulado positivamente. La actividad bactericida en suero se midió para cada uno de los sueros combinados y los resultados se muestran en la siguiente tabla.

ABS hecha sobre sueros combinados de ratones inmunizados con	título ABS
ampollas TbpA-Hsf	774
ampollas TbpA	200
ampollas Hsf	50
ampollas CPS(-) PorA(-)	50
Mezcla de sueros anti-TbpA + anti-Hsf	1162

20 Los resultados de la tabla anterior muestra que la mezcla de antisueros anti-Hsf y anti-TbpA provocaba una actividad bactericida en suero mucho mayor que la conseguida por cada antisuero individualmente. El efecto sinérgico parece conseguirse por la presencia de anticuerpos tanto contra Hsf como contra TbpA.

Ejemplo 19: Proteínas Hsf truncadas pueden combinar sinérgicamente con TbpA

25 Se hizo una serie de construcciones truncadas de Hsf usando procedimientos de biología molecular convencionales. Éstas incluyen una construcción que codifica los aminoácidos 1 a 54 que contiene la secuencia señal de Hsf y los aminoácidos 134 a 592 de Hsf (Tr1Hsf). Una segunda Hsf truncada contenía los aminoácidos 1-53 de la secuencia señal de Hsf seguida de los aminoácidos 238-592 de Hsf (Tr2Hsf). Estas dos construcciones truncadas de Hsf y Hsf de longitud completa se introdujeron en *N. Meningitidis B* cepa MC58 siaD-, Opc-, PorA- de modo que su expresión estuviera regulada positivamente y se produjeron vesículas de membrana externa usando los procedimientos descritos anteriormente.

30 Las preparaciones de vesícula de membrana externa se adsorbieron en Al(OH)3 y se inyectaron en ratones en los días 0, 21 y 28. En el día 42, los ratones se exanguinaron y se prepararon los sueros. Los sueros se mezclaron con sueros de ratones vacunados con VME de TbpA regulada positivamente y se realizaron las actividades bactericidas en suero como se ha descrito anteriormente.

35 **Resultados**

Grupo	Títulos bactericidas en suero	
	H44/76	CU385
MC58 PorA+ siaD+	25600	25600
MC58 PorA- siaD- Hsf	1530	800
MC58 PorA- siaD- Tr1Hsf	1015	1360
MC58 PorA- siaD- Tr2Hsf	50	50
Control negativo	50	50

(continuación)

Grupo	Títulos bactericidas en suero	
	H44/76	CU385
TbpA + MC58 PorA+ siaD+	25600	24182
TbpA + MC58 PorA- siaD- Hsf	2595	1438
TbpA + MC58 PorA- siaD- Tr1Hsf	4383	2891
TbpA + MC58 PorA- siaD- Tr2Hsf	1568	742
TbpA + control negativo	778	532

- Los resultados mostrados en la tabla anterior revelan que el primer truncamiento (Tr1Hsf) provoca una respuesta inmune que es capaz de combinar con antisueros contra TbpA para producir una actividad bactericida en suero mayor que cuando se usa Hsf de longitud completa. Sin embargo, el grado de truncamiento es importante y el truncamiento producido en Tr2 tiene un efecto nocivo en comparación con Hsf de longitud completa. La actividad bactericida potenciada de Tr1Hsf se observó como ambas cepas usadas.

Ejemplo 20: Actividad bactericida en suero de anticuerpos contra TbpA, Hsf y una tercera proteína de meningococos

- Se usó *N. meningitidis* cepa H66/76 en que PorA y los polisacáridos capsulares estaban regulados negativamente como se ha descrito anteriormente, como cepa de fondo para regular positivamente TbpA y Hsf, LbpB, D15, PilQ o NspA usando el procedimiento descrito anteriormente. Se prepararon vesículas de membrana externa a partir de cada cepa como se ha descrito anteriormente. Se prepararon FHAb, FrpC, FrpA/C y Hap recombinantes usando técnicas descritas anteriormente en el presente documento y conocidas en la técnica (como se describe en los documentos PCT/EP99/02766, WO92/01460 y WO98/02547).
- Las preparaciones de vesícula de membrana externa y las proteínas recombinantes se adsorbieron en Al(OH)₃ y se inyectaron en ratones en los días 0, 21 y 28. En el día 42, los ratones se exanguinaron y se prepararon los sueros. Se mezclaron los sueros contra VME con TbpA y Hsf regulados positivamente con sueros de ratones vacunados con VME que contenían VME con LbpB, D15, PilQ o NspA regulados positivamente o FHAb, FrpC, FrpA/C o Hap recombinante y se realizaron las actividades bactericidas en suero como se ha descrito anteriormente.

20 Resultados

Los resultados se muestran en la siguiente tabla. En ensayos usando la cepa homóloga H44/76, la adición de anticuerpos contra un tercer antígeno de meningococos, con la excepción de FrpC, no produjo un título bactericida en suero mayor que el producido usando anticuerpos contra TbpA y Hsf solos.

- Sin embargo, la adición de anticuerpos contra un tercer antígeno fue ventajosa en las actividades bactericidas en suero usando una cepa heteróloga. Los anticuerpos contra D15 (OMP85), Hap, FrpA/C y LbpB fueron particularmente eficaces en el aumento del título bactericida en suero contra la cepa CU385.

Mezcla de antisueros	Título bactericida en suero	
	H44/76	CU385
anti-TbpA-Hsf y sueros no inmunes	5378	2141
anti-TbpA-Hsf y anti-FHA	5260	2563
anti-TbpA-Hsf y anti-Hap	4577	5150
anti-TbpA-Hsf y anti-FrpA/C	5034	4358
anti-TbpA-Hsf y anti-LbpB	5400	4834
anti-TbpA-Hsf y anti-D15	4823	4657
anti-TbpA-Hsf y anti-PilQ	4708	2242
anti-TbpA-Hsf y anti-NspA	4738	2518
anti-TbpA-Hsf y anti-FrpC	6082	2300

Ejemplo 21: Efecto de FrpB KO en vesículas de membrana externa sobre su capacidad de provocar una respuesta inmune bactericida en cepas homólogas y heterólogas

- Se usaron dos cepas de *N. meningitidis* H44/76 para preparar preparaciones de vesícula de membrana externa como se describe en el documento WO01/09350, usando una extracción con DOC al 0,1% de modo que el contenido de LOS fuera de aproximadamente el 20%. La cepa B1733 es siaD(-), PorA (-), tiene regulación positiva de Tr1 Hsf (ejemplo 19) y 1gtB está inactivado. La cepa B 1820 B1733 es siaD(-), PorA(-), tiene regulación positiva de Tr1 Hsf, 1gtB está inactivado y FrpB está también inactivado. Ambas cepas se cultivaron en medio suplementado con Desferal 60 μ M de modo que estuvieran reguladas positivamente proteínas reguladas por hierro tales como

LbpA/B y TbpA/B.

Las preparaciones de ampolla se adsorbieron en Al(OH)₃ y se inyectaron 5 µg por vía intramuscular en grupos de 30 ratones en el día 0 y el día 21. Se tomaron muestras de sangre en el día 28.

5 Se realizaron ensayos bactericidas en suero en tres cepas L3 (la cepa homóloga de tipo silvestre H44/76 y dos cepas heterólogas L3; NZ124 y M97250687), como se describe en el ejemplo 17.

Resultados

Ampollas usadas para inoculación	H44/76 MGT SC	M97250687 MGT SC	NZ124 MGT SC
B1733	1518 30/30	151 11/30	70 4/29
B1820	781 19/30	1316 24/30	276 19/30
MGT indica la media geométrica del título de los sueros en las ABS. SC indica la cantidad de ratones de seroconversión (título ABS >1/100).			

10 Los resultados muestran claramente que ampollas FrpB KO (B1820) inducen una mejor respuesta bactericida cruzada heteróloga que ampollas FrpB(+) (B 1733). Los títulos ABS fueron mayores y una mayor proporción de ratones tuvieron seroconversión en las cepas M97250687 y NZ124. Los resultados en la cepa homóloga no fueron tan buenos cuando se delecionaba FrpB. Estos datos sugieren que FrpB dirige la respuesta inmune, pero como esta proteína de membrana externa es altamente variable, anticuerpos contra esta proteína son solamente capaces de inducir eliminación de la cepa homóloga.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende:
 - (i) un antígeno de proteína autotransportadora de *Neisseria* que es NadA o Hsf;
 - (ii) un antígeno de proteína de adquisición de Fe de *Neisseria* que es Lipo28 o TbpA; y
 - (iii) una composición de vesícula de membrana externa que comprende LPS inmutotipo L3;
- 5 y en la que dichos antígenos, cuando están presentes en una vesícula de membrana externa, han sido regulados positivamente en la vesícula de membrana externa.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el antígeno de proteína autotransportadora de *Neisseria* y el antígeno de proteína de adquisición de Fe de *Neisseria* están aislados.
- 10 3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha composición inmunogénica comprende tanto una composición de subunidad como la composición de vesícula de membrana externa.
4. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición de vesícula de membrana externa comprende LPS inmutotipo L3,7,9.
- 15 5. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición de vesícula de membrana externa comprende una concentración de LPS inmutotipo L3 que se puede obtener usando extracción con desoxicolato al 0,02-0,4%.
6. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que al menos uno de los antígenos de *Neisseria* es derivado de *Neisseria meningitidis*.
- 20 7. La composición inmunogénica de la reivindicación 6, en la que todos los antígenos de *Neisseria* son derivados de *Neisseria meningitidis*.
8. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares bacterianos.
9. La composición inmunogénica de la reivindicación 8, en la que los polisacáridos u oligosacáridos capsulares son derivados de bacterias seleccionadas entre el grupo que consiste en: *Neisseria meningitidis* serogrupo A, C, Y y W-135.
- 25 10. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente un adyuvante.
11. La composición inmunogénica de la reivindicación 10, en la que el adyuvante comprende una sal de aluminio.
- 30 12. La composición inmunogénica de la reivindicación 11, en la que la sal de aluminio es gel de hidróxido de aluminio.
13. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que el antígeno de proteína autotransportadora de *Neisseria* es NadA.
14. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que el antígeno de proteína de adquisición de Fe de *Neisseria* es Lipo28.
- 35 15. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, que comprende un antígeno adicional que es una proteína asociada a membrana de *Neisseria*.
16. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, que comprende un antígeno adicional seleccionado entre el grupo que consiste en: GNA1870, Hap, LbpB y Omp85.
- 40 17. La composición inmunogénica de la reivindicación 15 ó 16, en la que el antígeno adicional está aislado.

Figura 1

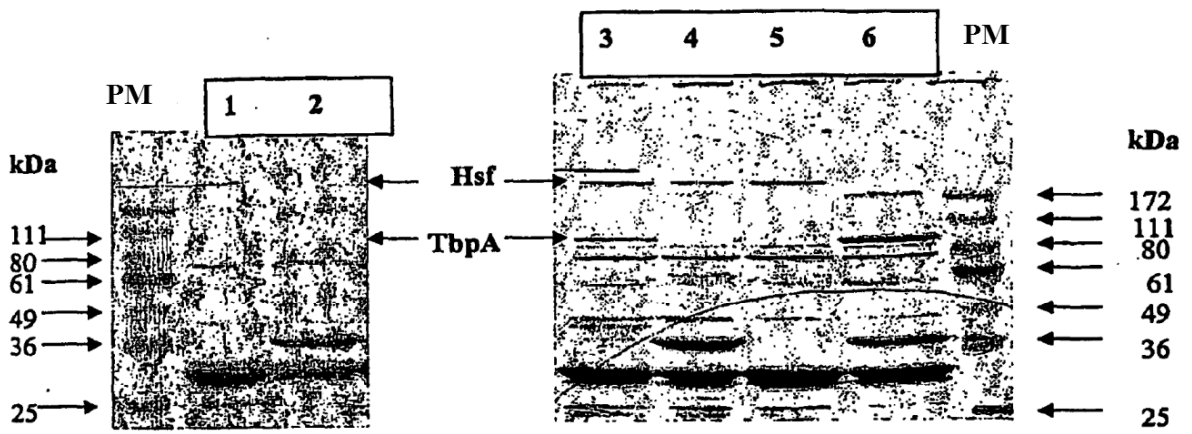


Figura 2

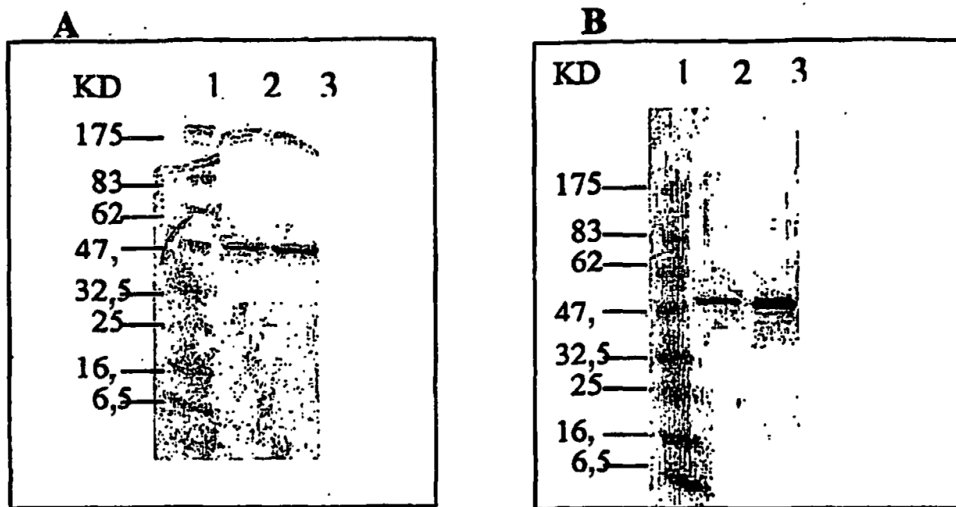


Figura 3

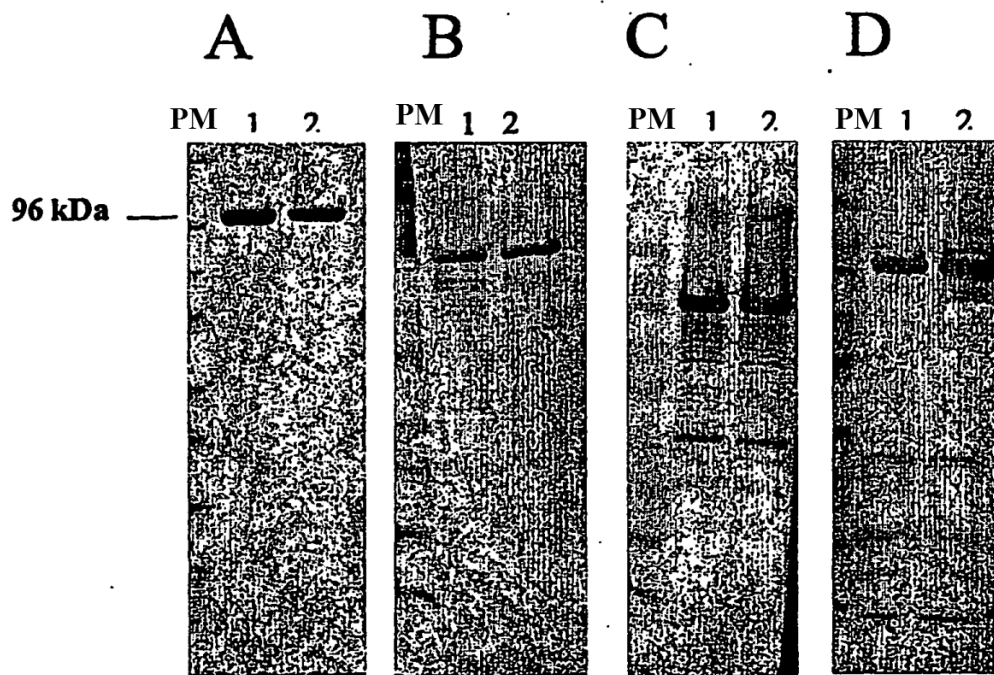


Figura 4

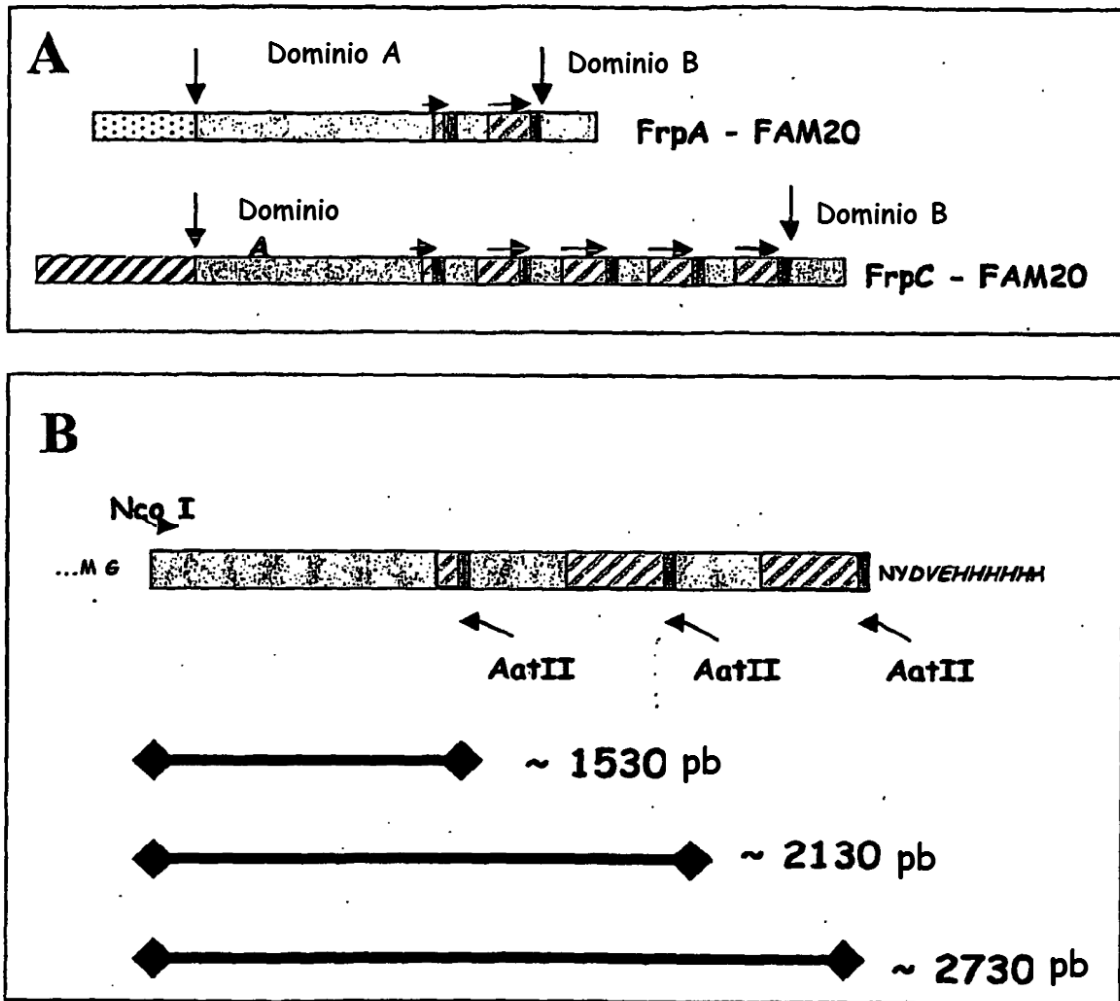


Figura 5

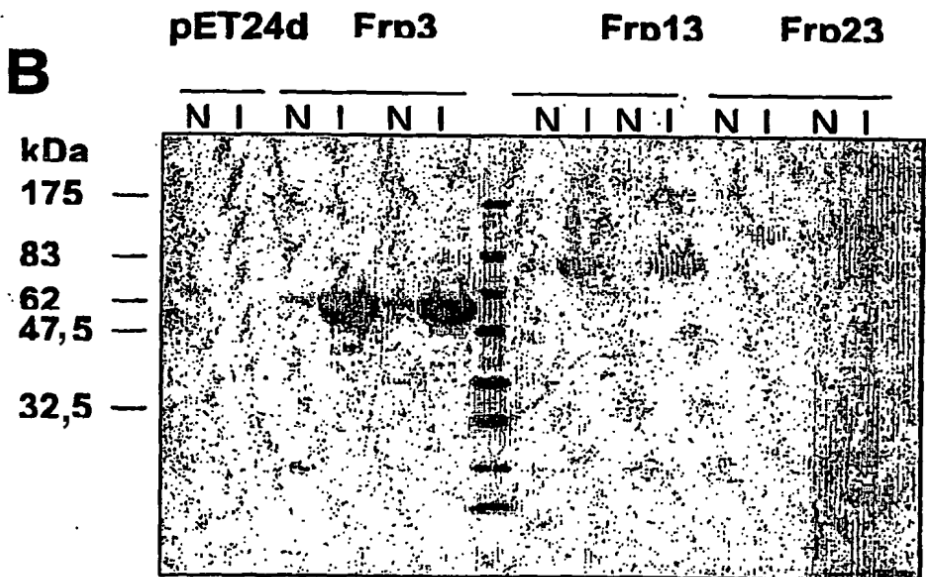
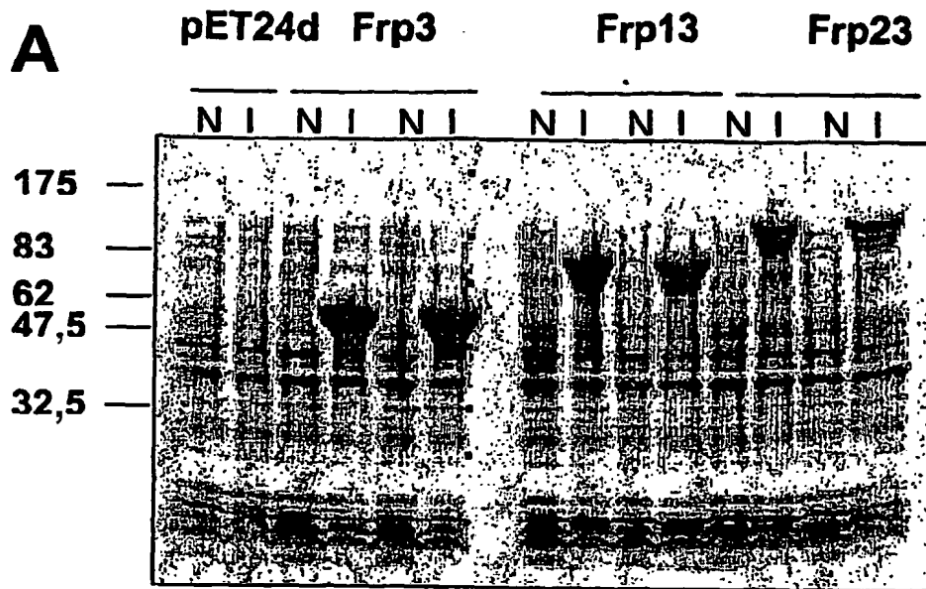


Figura 6

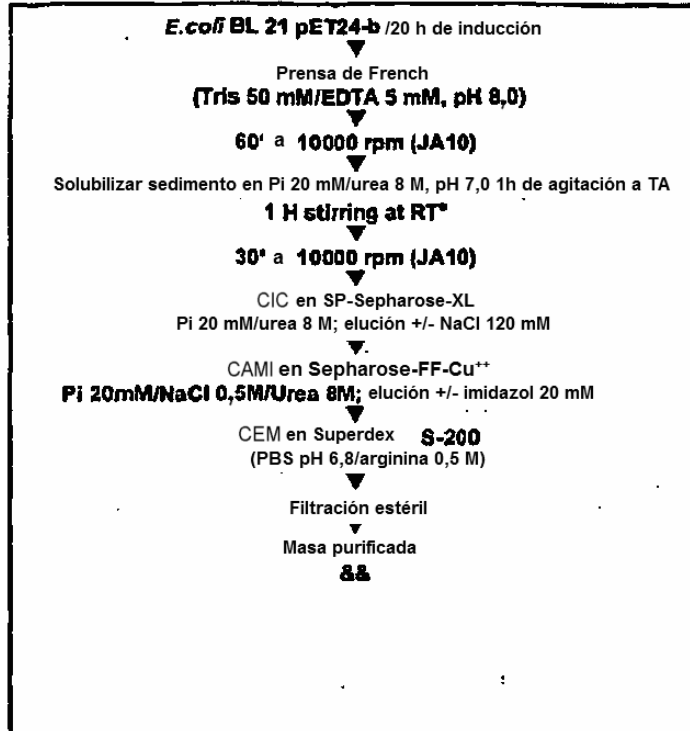
5' -

ATGAATAAAGGTTTACATCGCATTATCTTTAGTAAAAAGCACAGCACCATGGTTGCAGTAGCCGAAACT
 GCCAACAGCCAGGGCAAAGGTAAACAGGCAGGCAGTTCGGTTTCTGTTTCACTGAAAACCTTCAGGCCGAC
 CTTTGC GGCAAACCTCAAACCACCCCTTAAAACCTTTGGTCTGCTCTTTGGTTTCCCTGAGTATGGTATTG
 CCTGCCCATGCCCAAATTACCACCGACAAATCAGCACCTAAAAACCAGCAGGTCGTTATCCTTAAAACC
 AACACTGGTGCCTTGGTGAATATCCAAACTCCGAATGGACGCGGATTGAGCCACAACCGCTATACG
 CAGTTTGTATGTTGACAACAAGGGGCAGTGTAAACAACGACCGTAACAATAATCCGTTTGTGGTCAAA
 GGCAGTGC GCAATTGATTTTGAACGAGGTACGCGGTACGGCTAGCAAACCTCAACGGCATCGTTACCGTA
 GCGGTCAAAGGCCGACGTGATTATTGCCAACCCCAACGGCATTACCGTTAATGGCGCGGCTTTAAA
 AATGTGGTGGGGCATCTTAACTACCGGTGCGCCCCAAATCGGCAAAGACGGTGCCTGACAGGATTT
 GATGTGCGTCAAGGCACATTGACCGTAGGAGCAGCAGGTTGGAATGATAAAGGCGGAGCCGACTACACC
 GGGTACTTGCTCGTGCAGTTGCTTTGCAGGGGAAATTACAGGGTAAAAACCTGGCGGTTTCTACCGGT
 CCTCAGAAAGTAGATTACGCCAGCGGCGAAATCAGTGCAGGTACGGCAGCGGTTACGAAACCGACTATT
 GCCCTTGATACTGCCGCCTGGGCGGTATGTACGCCGACAGCATCACACTGATTGCCAATGAAAAGGC
 GTAGGCGTCAAATAATGCCGGCACACTCGAAGCGGCCAAGCAATTGATTGTGACTTCGTGAGGCCGATT
 GAAAACAGCGGCCGATCGCCACCCTGCCGACGGCACCGAAGCTTCACCGACTTATCTCTCCATCGAA
 ACCACCGAAAAGGAGCGGCAGGCACATTTATCTCCAATGGTGGTGGATCGAGAGCAAAGGCTTATTG
 GTTATTGAGACGGGAGAAGATATCAGCTTGCCTAACGGAGCCGTGGTGCAGAATAACGGCAGTCCGCA
 GCTACCACGGTATTAATGCTGGTCAATAATTTGGTGAATTGAGAGCAAACCTAATGTGAACAATGCCAAA
 GGCCCGGCTACTCTGTCCGGCCGACGGCCGTACCGTCAATCAAGGAGGCCAGTATTCAGACTGGCACTACC
 GTATACAGTTCAGCAAAGGCAACGCCGAATTAGGCAATAACACACGCATTACCGGGCAGATGTTACC
 GTATTATCCAACGGCACCATCAGCAGTTCGCCGTAATAGATGCCAAAGACCCGCACACATCGAAGCA
 GGCAAACCGCTTTCTTTGGAAGCTTCAACAGTTACCTCCGATATCCGCTTAAACGGAGGCAGTATCAAG
 GCGGCAAGCAGCTTGCTTTACTGGCAGACGATAACATTACTGCCAAAACCTACCAATCTGAATACTCCC
 GGCAATCTGTATGTTTACATACAGGTAAGATCTGAATTTGAATGTTGATAAAGATTTGCTGCGGCCAGC
 ATCCATTTGAAATCGGATAACGCTGCCCATATTACCGGCACCAGTAAAACCCCTCACTGCCTCAAAGAC
 ATGGGTGTGGAGGCAGGCTCGCTGAATGTTACCAATACCAATCTGCGTACCAACTCGGGTAATCTGCAC
 ATTCAGGCAGCCAAAGGCAATATTCAGCTTCGCAATACCAAGCTGAACGCAGCCAAAGGCTCTCGAAACC
 ACCGATTGCAGGGCAATATCGTTTACAGCGGCTTCATGCTGTTTCTGCAGACGGTCATGTATCCTTA
 TTGGCCAAACGGTAATGCCGACTTTACCGGTACAATAACCTGACAGCCAAAGGCCGATGTCAATGCAGGA
 TCGGTTGGTAAAGGCCGCTGAAAGCAGACAATAACCAATATCACTTCATCTTCAGGAGATATTACGTTG
 GTTGCCGGCAACGGTATTTCAGCTTGGTGACGGAAAACAACGCAATCAATCAACGGAAAACACATCAGC
 ATCAAAAACAACGGTGGTAATGCCGACTTAAAAAACCTTAACTCCATGCCAAAAGCGGGCATTGAAC
 ATTCATTCCGACCGGGCATTGAGCATAGAAAATACCAAGCTGGAGTCTACCCATAATACGCATCTTAAT
 GCACAACACGAGCGGGTAACGCTCAACCAAGTAGATGCCTACGCACACCGTCACTAAGCATTACCGGC
 AGCCAGATTTGGCAAACGACAACTGCCTTCTGCCAACAAGCTGGTGGCTAACGGTGTATTGGCACTC
 AATGCGGCTATTCCCAAATTGCCGACAACACCACGCTGAGAGCGGGTGAATCAACCTTACTGCCGGT
 ACCGCCCTAGTCAAGCGGGCAACATCAATTGGAGTACCGTTTGCACAAAACCTTTGGAAGATAATGCC
 GAATTTAAAACCATTTGGCCGGACGGCTGAATATTGAAGCAGGTAGCGGCACATTAACCATCGAACCTGCC

AACCGCATCAGTGCGCATACCGACCTGAGCATCAAAACAGGCGGAAAATTGCTGTTGTCTGCAAAAGGA
 GGAAATGCAGGTGCGCCTAGTGCTCAAGTTTCCTCATTGGAAGCAAAAGGCAATATCCGTCTGGTTACA
 GGAGAAACAGATTTAAGAGGTTCTAAAATTACAGCCGGTAAAAACTTGGTTGTGCCACCACCAAAGGC
 AAGTTGAATATCGAAGCCGTAAACAACCTCATTCAGCAATTATTTTCTACACAAAAGCGGCTGAACTC
 AACCAAAAATCCAAAGAATTGGAAACAGCAGATTGCGCAGTTGAAAAAAGCTCGCCTAAAAGCAAGCTG
 ATTCCAACCCCTGCAAGAAGAACGCGACCGTCTCGCTTTCTATATTCAAGCCATCAACAAGGAAGTTAAA
 GGTAAAAAACCCAAAGGCAAAGAATACCTGCAAGCCAAGCTTTCTGCACAAAATATTGACTTGATTTCC
 GCACAAGGCATCGAAATCAGCGGTTCCGATATTACCGCTTCCAAAAACTGAACCTTCACGCCGAGGC
 GTATTGCCAAAAGGCAGCAGATTGAGAGGCGGCTGCTATTCTGATTGACGGCATAACCGACCAATATGAA
 ATTGGCAAGCCCACCTACAAGAGTCACTACGACAAAGCTGCTCTGAACAAGCCTTCACGTTTGACCCGAA
 CGTACAGGGGTAAGTATTCATGCAGCTGCGGCCTCGATGATGCACGTATTATTATCGGTGCATCCGAA
 ATCAAAGCTCCCTCAGGCAGCATAGACATCAAAGCCCATAGTGATATTGTACTGGAGGCTGGACAAAAC
 GATGCCTATACCTTCTTAAAAACCAAAGGTAAAAGCGGCAAAATCATCAGAAAAACCAAGTTTACCAGC
 ACCCGCGACCACCTGATTATGCCAGCCCCCGTCGAGCTGACCGCCAACGGCATAACGCTTCAGGCAGGC
 GGCAACATCGAAGCTAATACCACCCGCTTCAATGCCCTGCAGGTAAAGTTACCCTGGTTGCGGGTGAA
 GAGCTGCAACTGCTGGCAGAAGAAGGCATCCACAAGCACGAGTTGGATGTCCAAAAAAGCCGCCGCTTT
 ATCGGCATCAAGGTAGGCAAGAGCAATTACAGTAAAAACGAACTGAACGAAACCAAATTGCCTGTCCGC
 GTCGTGCCCCAACTGCAGCCACCCTTCAGGCTGGGATACCGTGCTCGAAGGTACCGAATTCAAAACC
 ACGCTGGCCGGTGCGGACATTCAGGCAGGTGTAGGCGAAAAGCCCGTGCCGATGCGAAAATTATCCTC
 AAAGGCATTGTGAACCGTATCCAGTCGGAAGAAAAATTAGAAACCAACTCAACCGTATGGCAGAAACAG
 GCCGGACGCGGCAGCACTATCGAAACGCTGAAACTGCCGAGCTTCGAAAGCCCTACTCCGCCCAAAC TG
 ACCGCCCCCGGTGGCTATATCGTCGACATTCGGAAGGCAATTTGAAAACCGAATCGAAAAGCTGGCC
 AACAGCCCCGAGTATGCCTATCTGAAACAGCTCCAAGTAGCGAAAAACACTAGTGGCCACCATCACCAT
 CACCATTA PARADA -3'

Figura 7

A



B

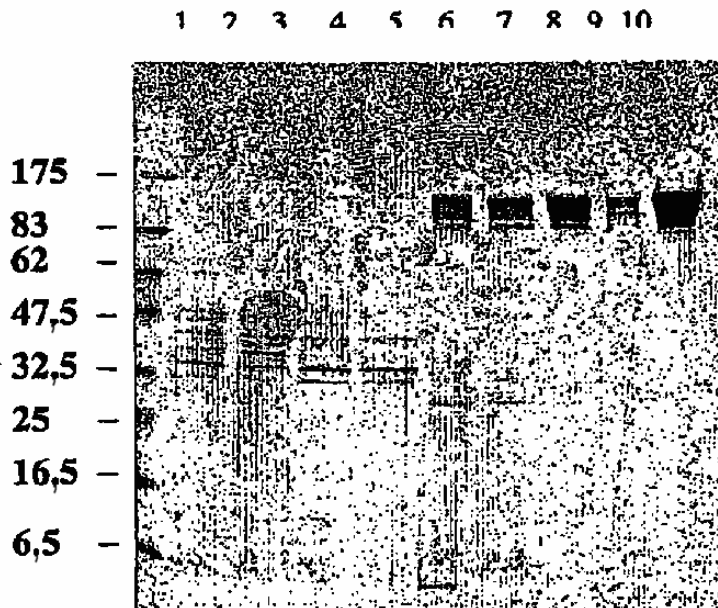


Figura 8A

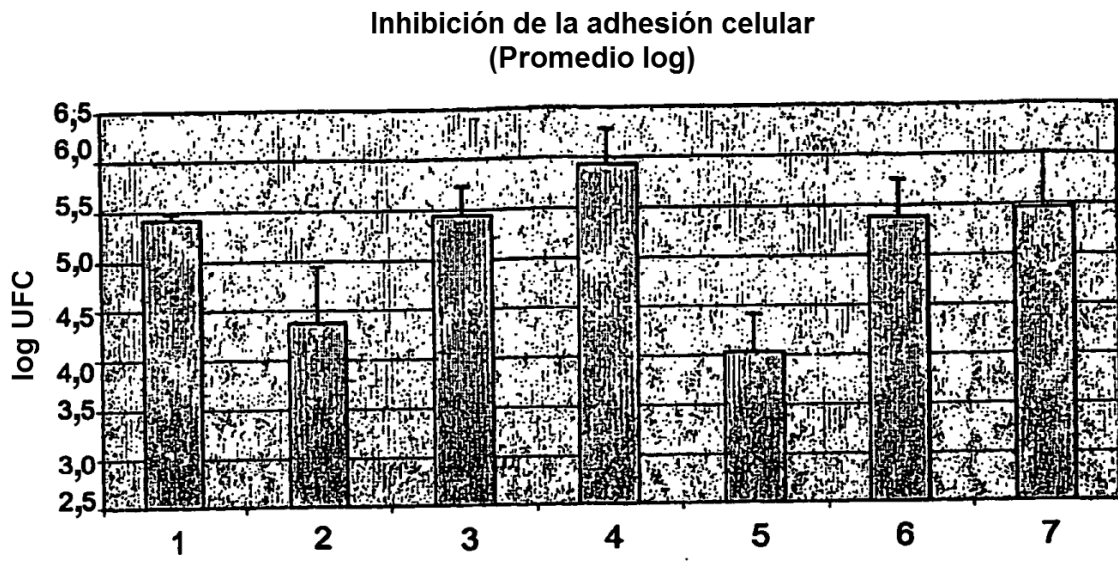


Figura 8B

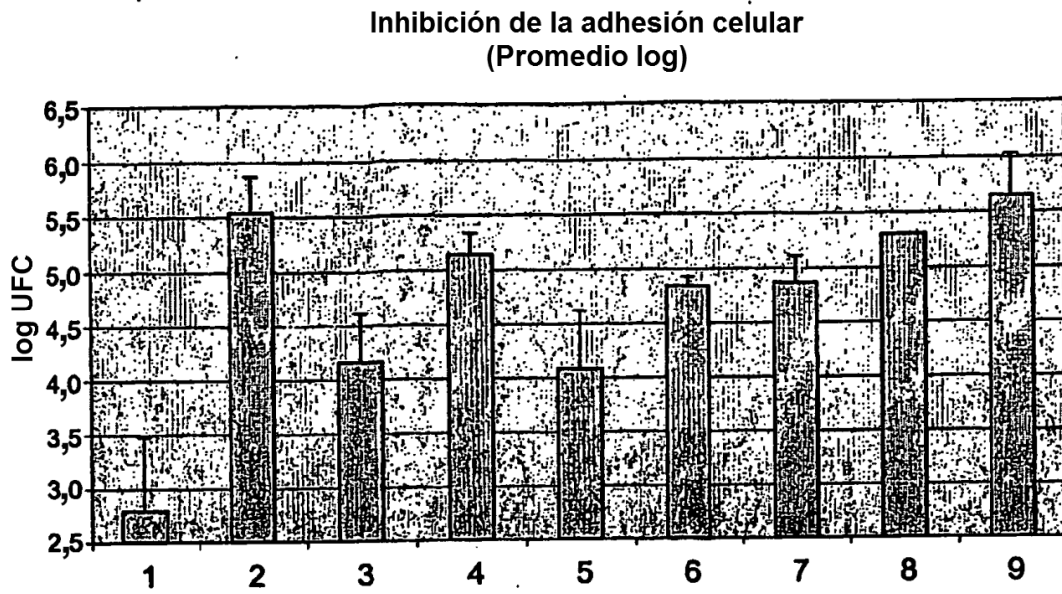


Figura 9

