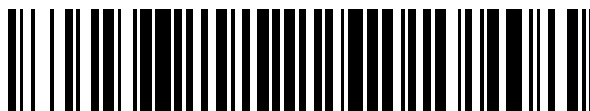


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 019**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/104 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2003** **E 10179783 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013** **EP 2258389**

54 Título: **Mejora de las vesículas de membrana externa bacteriana**

30 Prioridad:

30.08.2002 GB 0220194

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

17.09.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

PIZZA, MARIAGRAZIA;
SERRUTO, DAVIDE y
RAPPUOLI, RINO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 423 019 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

Mejora de las vesículas de membrana externa bacteriana.

5 CAMPO TÉCNICO

Esta invención está en el campo de preparación de vesícula para fines de inmunización.

10 TECNICA ANTERIOR

Uno de los varios enfoques para inmunizar contra infección de *N. meningitidis* es el uso de vesículas de membrana externa (VMEs). El Instituto Nacional Noruego de Salud Pública [por ejemplo, ref. 1] ha producido una vacuna eficaz de VME contra serogrupo B pero, aunque esta vacuna es segura y previene la enfermedad MenB, su eficacia se limita a la cepa usada para hacer la vacuna.

La vacuna "RIVM" se basa en vesículas que contienen seis serotipos PorA diferentes y ha demostrado ser inmunogénica en niños en ensayos clínicos en la fase II [2].

La Referencia 3 desvela una vacuna contra diferentes serotipos patogénicos del meningococo serogrupo B basada en VMEs que retienen un complejo proteico de 65 kDa. La Referencia 4 desvela una vacuna que comprende VMEs de cepas de meningococo creadas genéticamente, con las VMEs que comprenden: al menos una proteína de membrana externa (PME) de Clase 1 pero que no comprende PME de Clase 2/3. La Referencia 5 desvela VMEs que comprenden PMEs que tienen mutaciones en sus bucles superficiales y VMEs que comprenden derivados de lipopolisacárido meningocócico (LPS).

La Referencia 6 desvela composiciones que comprenden VMEs complementadas con proteínas de enlace de transferina (por ejemplo, TbpA y TbpB) y/o Cu, Zn-superóxido dismutasa. La Referencia 7 desvela composiciones que comprenden VMEs complementadas con varias proteínas. La Referencia 8 desvela preparaciones de vesículas de membrana obtenidas de *N. meningitidis* con un gen *fur* modificado.

Así como *N. meningitidis* del serogrupo B, las vesículas se han preparado para otras bacterias. La Referencia 9 desvela un proceso para preparar vacunas basadas en VME para meningococo del serogrupo A. Las referencias 10 y 11 desvelan vesículas de *N. gonorrhoeae*. La referencia 12 desvela preparaciones de vesícula a partir de *N. lactamica*. Las vesículas también se ha preparado de *Moraxella catarrhalis* [13, 14], *Shigella flexneri* [15, 16], *Pseudomonas aeruginosa* [15, 16], *Porphyromonas gingivalis* [17], *Treponema pallidum* [18], *Haemophilus influenzae* [19 y 20] y *Helicobacter pylori* [21].

Un inconveniente de las preparaciones de vesícula bacteriana es que los antígenos protectores importantes no están presentes. Para retener antígenos tales como NspA en preparaciones de VME, la referencia 20 muestra que la expresión de nspA debería aumentar con el gen eliminado *porA* y *cps* simultáneos. Es un objeto de la invención proporcionar más preparaciones de vesículas mejoradas, junto con procesos para su fabricación. En particular, es un objeto de la invención proporcionar vesículas que retengan importantes componentes inmunogénicos bacterianos de *N. meningitidis*.

45 DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

La invención proporciona una composición que comprende vesículas de membrana externa meningocócicas, un adyuvante de hidróxido de aluminio, un tampón de histidina y cloruro sódico, donde: (a) la concentración de cloruro sódico es superior a 7,5 mg/ml; y donde (b) la concentración de VMEs es inferior a 100 µg/ml.

La concentración de cloruro sódico es preferentemente superior a 8 mg/ml, y es más preferentemente aproximadamente 9 mg/ml.

La concentración de VMEs es preferentemente inferior a 75 µg/ml, por ejemplo aproximadamente 50 µg/ml.

El tampón de histidina tiene preferentemente entre pH 6,3 y pH 6,7, por ejemplo pH 6,5.

El adyuvante puede usarse en aproximadamente 3,3 mg/ml (expresado como concentración Al³⁺)

La bacteria de la que se preparan las VMEs es *N. meningitidis*. Dentro de *N. meningitidis*, puede usarse cualquiera de los serogrupos A, C, W135 e Y, pero es preferente preparar vesículas del serogrupo B. Las cepas preferentes dentro del serogrupo B son MC58, 2996, H4476 y 394/98.

Para reducir la actividad pirogénica, es preferente que la bacteria tenga bajos niveles de endotoxina (LPS). Las bacterias mutantes adecuadas son conocidas, por ejemplo, *Neisseria* mutante [23]. Los procesos para preparar

membranas externas agotadas de LPs de bacterias Gram negativas se desvelan en la referencia 25.

La bacteria puede ser una bacteria de tipo salvaje, o puede ser una bacteria recombinante. Las bacterias recombinantes preferentes sobreexpresan (en relación con la cepa de tipo salvaje correspondiente) inmunógenos tales como NspA, 287, 741, TbpA, TbpB, superóxido dismutasa [6], et. La bacteria puede expresar más de una proteína de membrana externa PorA de Clase I, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 ó 6 o subtipos de PorA: P1.7,16; P1.5,2; P1.19,15; P1.5c,10; P1.12,13; y P1.7h,4 (por ejemplo, refs. 26,27].

Las vesículas

Las VMEs se preparan a partir de la membrana externa de bacterias cultivadas. Pueden obtenerse de bacterias cultivadas en medio de cultivo en caldo o sólido, preferentemente separando las células bacterianas del medio de cultivo (por ejemplo, mediante filtración o mediante centrifugación a baja velocidad para formar bolitas de las células), lisando las células (sin detergente), y separando una fracción de membrana externa de moléculas citoplasmáticas (por ejemplo, mediante filtración, mediante precipitación diferencial o agregación de membranas externas y/o VMEs, mediante métodos de separación por afinidad usando ligandos que específicamente reconocen moléculas de membrana externa, o mediante centrifugación a alta velocidad que forma bolitas de membranas externas y/o VMEs).

Las VMEs pueden distinguirse de microvesículas (MVs [28] y "VMes nativas" ("VMENs" [66], que son vesículas de membrana que ocurren de manera natural que se forman espontáneamente durante el crecimiento bacteriano y que se liberan en el medio de cultivo. Las MVs pueden obtenerse cultivando *Neisseria* en medio de cultivo de caldo, separando las células enteras del medio de cultivo de caldo (por ejemplo, mediante filtración o mediante centrifugación a baja velocidad para formar bolitas solamente de las células y no de las bulas más pequeñas), y después recogiendo las MVs que están presentes en el medio agotado de células (por ejemplo, mediante filtración, mediante precipitación diferencial o agregación de MVs, mediante centrifugación a alta velocidad que forma bolitas de MVs). Las cepas para uso en la producción de MVs pueden seleccionarse generalmente en base a la cantidad de MVs producidas en cultivo. Las referencias 29 y 30 describen *Neisseria* con alta producción de MV.

Composiciones farmacéuticas inmunogénicas

Para administración a un paciente, las vesículas se formulan como composiciones inmunogénicas, y más preferentemente como composiciones adecuadas para su uso como una vacuna en humanos (por ejemplo, niños o adultos). Las vacunas de la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad después de la infección), pero típicamente serán profilácticas.

La composición de la invención es preferentemente estéril.

La composición de la invención está preferentemente libre de pirógenos.

La composición de la invención tiene generalmente un pH de entre 6,0 y 7,0, más preferentemente de entre 6,3 y 6,9, por ejemplo 6,6±0,2. La composición está preferentemente amortiguada en este pH.

Otros componentes adecuados para la administración humana se desvelan en la referencia 44.

La composición comprende un adyuvante. El adyuvante es hidróxido de aluminio (incluyendo oxihidróxidos).

Las vesículas en la composición de la invención estarán presentes en "cantidades inmunológicamente efectivas", es decir, la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una única dosis o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o prevención de la enfermedad. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a ser tratado, edad, el grupo taxonómico del individuo a ser tratado (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del doctor que lo está tratando de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad corresponda a un rango relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios. El tratamiento de la dosis puede ser un programa de una única dosis o un programa con múltiples dosis (por ejemplo, incluyendo la dosis de revacunación). La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunoreguladores.

Típicamente, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a ser tratados pueden ser animales; en particular, pueden tratarse sujetos humanos. Las vacunas son particularmente útiles para vacunar a niños y adolescentes.

La composición puede comprender vesículas de más de un serosubtipo de *N. meningitidis* [28]. Similarmente, la composición puede comprender más de un tipo de vesícula, por ejemplo, MVS y VMEs.

Así como las vesículas, la composición de la invención puede comprender más antígenos. Por ejemplo, la composición puede comprender más de uno de los siguientes antígenos adicionales:

- 5 - antígenos de *Helicobacter pylori* tal como CagA [67 a 70], VacA [71, 72], NAP [73, 74, 75], HopX [por ejemplo, 76], HOpY [por ejemplo, 76] y/o ureasa.
- un antígeno sacárido de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 y/o Y, tal como oligosacárido desvelado en la ref. 77 del serogrupo C [véase también ref. 78] o los oligosacáridos de la ref. 79.
- un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, 80, 81, 82].
- 10 - un antígeno de virus de hepatitis A, tal como virus inactivado [por ejemplo, 83, 84].
- un antígeno de virus de hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o núcleo [por ejemplo, 84, 85].
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (HAF) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 (por ejemplo, refs. 86 y 87).
- un antígeno de difteria, tal como un toxoide diftérico (por ejemplo, capítulo 3 de ref. 88] por ejemplo el mutante CRM₁₉₇ [por ejemplo, 89].
- 15 - un antígeno de tétano, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 4 de ref. 108].
- un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae B* [por ejemplo 78]
- un antígeno de virus de hepatitis C [por ejemplo 90].
- un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo 91, 92, 93, 94].
- 20 - un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo refs. 95 a 101].
- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo 102].
- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo 103].
- antígeno(s) de polio [por ejemplo 104, 105] tal como OPV o, preferentemente, IPV.
- antígeno(s) de rabia [por ejemplo 106] tal como virus inactivado liofilizado [por ejemplo 107, RabAvert™].
- antígenos de sarampión, paperas y/o rubeola [por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de la ref. 108].
- 25 - antígeno(s) de influenza (por ejemplo capítulo 19 de ref. 108], tales como proteínas superficiales de hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo 109].
- un antígeno de proteína de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo grupo B) [por ejemplo 110, 111].
- un antígeno sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo grupo B).
- 30 - un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo grupo A) [por ejemplo 111, 112, 113].
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 114].
- un antígeno de *Bacillus anthracis* [por ejemplo 115, 116, 117].
- un antígeno de un virus en la familia flaviviridae (flavivirus género), tal como virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis japonesa, cuatro serotipos de virus del dengue, encefalitis transmitida por garrapata, virus del Nilo occidental.
- 35 - un antígeno pestivirus, tal como virus de fiebre porcina clásica, virus de diarrea viral bovina y/o virus de enfermedad de la frontera.
- un antígeno de parvovirus, por ejemplo, de parvovirus B19.
- una proteína priónica (por ejemplo, la proteína priónica CJD).
- 40 - una proteína amiloide, tal como péptido beta [118]
- un antígeno cancerígeno, tal como los listados en la Tabla 1 de ref. 119 o en las tablas 3 y 4 de la ref. 120.

La composición puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales.

- 45 Los antígenos de proteína tóxicos pueden detoxificarse donde sea necesario (por ejemplo, detoxificación de toxina pertussis mediante medios químicos y/o genéticos [87]).

- 50 Donde se incluye el antígeno de difteria en la composición es preferente también incluir antígeno de tétano y antígenos de pertussis. Similarmente, donde se incluye un antígeno de tétano es también preferente incluir antígenos de difteria y pertussis. Similarmente, donde se incluye un antígeno de pertussis es también preferente incluir antígenos de difteria y tétano. Por lo tanto, las combinaciones DTP son preferentes.

- 55 Los antígenos de sacárido están preferentemente en forma de conjugados. Las proteínas transportadoras para los conjugados incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [121], péptidos sintéticos [121, 123], proteínas de choque térmico [124, 125], proteínas de pertussis [126, 127], proteína D de *H. influenzae* [128], citoquinas [129], linfoquinas [129], hormonas [129], factores del crecimiento [129], toxina A y B de *C. difficile* [130], proteínas para absorción de hierro [131], etc. Una proteína transportadora preferente es el toxoide de difteria CRM₁₉₇ [132].

- 60 Los antígenos de serogrupo B de *N. meningitidis* también pueden añadirse a las composiciones VME. En particular, un antígeno de proteína tal como el desvelado en las refs. 133 y 139 puede añadirse.

- 65 Los antígenos en la composición estarán típicamente presentes en una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para obtener una respuesta inmune contra ese antígeno.

Métodos de tratar a los pacientes

La invención proporciona composiciones de la invención para su uso como medicamentos.

5 Las composiciones de la invención pueden usarse en un método para provocar una respuesta inmune en un paciente, que comprende la administración a un paciente de una composición de la invención. La respuesta inmune es preferentemente protectora contra enfermedad meningocócica, y puede comprender una respuesta inmune humoral y/o una respuesta inmune celular. El paciente es preferentemente un niño.

10 El método puede provocar una respuesta de revacunación, en un paciente al que ya se ha sensibilizado contra *N. meningitidis*. Los regímenes de sensibilización/revacunación subcutáneos e intranasales para VMEs se desvelan en la ref. 65.

15 La invención también proporciona el uso de una vesícula de la invención en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un paciente. El medicamento es una composición inmunogénica como se ha definido anteriormente (por ejemplo, una vacuna). El medicamento es preferentemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por una *Neisseria* (por ejemplo, meningitis, septicemia, gonorrea, etc.).

20 Los usos de la invención pueden implicar la administración de vesículas de más de un serosubtipo de *N. meningitidis* [por ejemplo, ref. 28].

Definiciones

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

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

30 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Donde sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de las definiciones de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 Las Figuras 1 y 2 muestran la presencia/ausencia de (1) proteína "287" y (2) proteína "741" en bacterias ("TOT") y vesículas de membrana externa ("VME") preparadas a partir de las cepas MC58, H4476 y 394/98 de *N. meningitidis*. La flecha muestra la posición de "287" en la Figura 1 y "741" en la Figura 2.

MODOS PARA REALIZAR LA INVENCION

La preparación VME

45 Las VMEs se prepararon bien mediante los métodos "noruegos" de la técnica anterior (cepas H4476 y 394/98) o mediante los siguientes procesos (cepa MC58):

- Las bacterias de 2-5 placas se cosecharon en 10 ml de tampón 10mM Tris-HCl (pH 8,0) y se eliminaron con calor a 56°C durante 45 minutos. Las muestras se sometieron después a ultrasonido sobre hielo (ciclo de trabajo 50 durante 10 minutos con la punta en 6/7) para afectar a las membranas.
- 50 - Los restos celulares se retiraron mediante centrifugación a 5000 g durante 30 minutos a 4°C, o 10000 g durante 10 minutos.
- El sobrenadante se volvió a centrifugar a 50000 g durante 75 minutos a 4°C.
- La bolita se volvió a suspender en 7 ml de 2% N-lauroil sarcosinato (Sarkosyl) en 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) durante 20 minutos a temperatura ambiente para solubilizar las membranas citoplasmáticas.
- 55 - La muestra se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos para retirar las partículas y el sobrenadante se centrifugó a 75000 g durante 75 minutos a 4°C. La muestra se lavó en 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) y se centrifugó a 75000 g durante 75 minutos.
- La bolita se volvió a suspender en 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) o agua destilada.

60 Las composiciones de bacterias y VME se probaron mediante ensayo de transferencia Western para la presencia de NspA, 287 y 741 (Figuras 1 y 2) y los resultados se resumen en la siguiente tabla:

65

Cepa	Detergente	NspA		287		741	
		Bacteria	VME	Bacteria	VME	Bacteria	VME
MC58	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
H44/76	+	+++	- ^[20]	+++	-	+++	+
394/98	+	+++	n.d	+++	++	+++	+

A diferencia de los métodos basados en detergente de la técnica anterior, por lo tanto, la ausencia de detergente da como resultado NspA que se retiene en VMEs y evita la pérdida de 287 y 741.

Formulación de VMEs preparadas de cepa de Nueva Zelanda de MenB

Las VMEs se prepararon de la cepa 394/98 serogrupo B de *N. meningitidis*. Éstas se formularon de dos maneras diferentes, con componentes que tienen las siguientes concentraciones:

	Formulación "A"	Formulación "B"
VMEs	50 µg/ml	50 µg/ml
Adyuvante de hidróxido de aluminio	3,3 µg/ml	3,3 µg/ml
Sacarosa	3%	--
Tampón de histidina, pH 6,5	--	5 mM
Cloruro sódico	--	9 mg/ml

La formulación "B" resultó ser inmunológicamente superior a la formulación "A". La formulación "B" difiere de la desvelada en la referencia 142 por tener la mitad de la concentración de VME, una mayor concentración de NaCl y un pH ligeramente diferente.

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

[1] Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338 (8775):1093-1096.

[2] de Kleijn *et al.* (2001) *Vaccine* 20:352-358.

[3] Patentes de Estados Unidos 5.597.572 y 5.747.653; véase también patente europea 0301992.

[4] Patente europea 0449958 (concedida de WO90/06696)

[5] Patente de Estados Unidos 5.705.161; véase también WO94/08021.

[6] Solicitud de patente internacional WO00/25811.

[7] Solicitud de patente internacional WO01/52885.

[8] Solicitud de patente internacional WO98/56901.

[9] Solicitud de patente internacional WO01/91788.

[10] Parmar *et al.* (1997) *Vaccine* 15:1641-1651.

[11] Solicitud de patente internacional WO99/59625.

[12] Solicitud de patente internacional WO00/50074.

[13] Patentes de Estados Unidos 5.552.146, 5.981.213 y 5.993.826; véase también WO93/03761.

[14] Zhou *et al.* (1998) *FEMS Microbiol Lett* 163:223-2288.

[15] Kadurugamuwa y Beveridge (1999) *Microbiology* 145:2051-2060.

[16] Solicitud de patente internacional WO97/05899.

[17] Kesavalu *et al.* (1992) *Infect. Immun.* 60:1455-1464.

[18] Blanco *et al.* (1999) *J Immunol* 163:2741-2746.

[19] Solicitud de patente internacional WO01/09350.

[20] Solicitud de patente internacional WO02/09746.

[21] Keenan *et al.* (1998) *FEMS Microbiol Lett* 161:21-27.

[22] Patente europea 0011243.

[23] Solicitud de patente internacional WO99/10497.

[24] Solicitud de patente internacional WO02/07763.

[25] Patente europea 0624376.

[26] Claassen *et al.* (1996) *Vaccine* 14:1001-1008.

[27] Peeters *et al.* (1996) *Vaccine* 14:1009-1015.

[28] Solicitud de patente internacional WO02/09643.

[29] Patente de Estados Unidos 6.180.111.

[30] Solicitud de patente internacional WO01/34642.

- [31] Martin *et al.* (1997) *J. Exp. Med.* 185:1173-1183.
- [32] Plante *et al.* (1999) *Infect. Immun.* 67:2855-2861.
- [33] Cadieux *et al.* (1999) *Infect. Immun.* 67:4955-4959.
- 5 [34] Moe *et al.* (1999) *Infect. Immun.* 67:5664-5675.
- [35] Martin *et al.* (2000) *J. Biotechnol.* 83:27-31.
- [36] Moe *et al.* (2001) *Infect. Immun.* 69:3762-3771.
- [37] Solicitud de patente internacional WO96/29412.
- [38] Solicitud de patente internacional WO00/71725.
- 10 [39] Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [40] Solicitud de patente internacional WO99/57280.
- [41] Solicitud de patente internacional WO03/020756 (SEQ IDS 1-22 en particular)
- [42] Solicitud de patente internacional WO00/66741.
- [43] Solicitud de patente internacional WO01/52885.
- 15 [44] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [45] *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)
- [46] WO90/14837.
- [47] WO02/26212.
- [48] WO98/33487.
- 20 [49] WO00/07621.
- [50] WO99/27960.
- [51] WO98/57659.
- [52] Solicitudes de patentes europeas 0835318, 0735898 y 0761231.
- 25 [53] Krieg (2000) *Vaccine* 19:618-622; Krieg (2001) *Curr opin Mol Ther* 2001 3:15-24; WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581 etc.
- [54] WO99/52549.
- [55] WO01/21207.
- [56] WO01/21152.
- [57] WO00/62800.
- 30 [58] WO00/23105.
- [59] WO99/11241.
- [60] Del Giudice *et al.* (1998) *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 19, número 1.
- [61] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [62] Johnson *et al.* (199) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- 35 [63] Solicitud de patente internacional WO00/50078.
- [64] Singh *et al.* (2001) *J. Cont. Rele.* 70:267-276.
- [65] Bakke *et al.* (2001) *Infect. Immun.* 69:5010-5015.
- [66] Katial *et al.* (2002) *Infect. Immun.* 70:702-707.
- [67] Covacci y Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592.
- 40 [68] WO93/18150.
- [69] Covacci *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5791-5795.
- [70] Tummuru *et al.* (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809.
- [71] Marchetti *et al.* (1998) *Vaccine* 16:33-37.
- [72] Telford *et al.* (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.
- 45 [73] Evans *et al.* (1995) *Gene* 153:123-127.
- [74] WO96/01272 y WO96/01273, especialmente SEQ ID NO: 6.
- [75] WO97/25429.
- [76] WO98/04702.
- 50 [77] Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- [78] Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [79] Solicitud de patente internacional WO03/007985.
- [80] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [81] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285,v.
- 55 [82] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [83] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [84] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [85] Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Supl:S63-68 y 79-80.
- [86] Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [87] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- 60 [88] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [89] Del Giudice *et al.* (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- [90] Hsu *et al.* (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- [91] Solicitud de patente internacional WO99/24578.
- [92] Solicitud de patente internacional WO99/36544.
- 65 [93] Solicitud de patente internacional WO99/57280.
- [94] Solicitud de patente internacional WO02/079243.

- [95] Solicitud de patente internacional WO02/02606.
 [96] Kalman *et al.* (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
 [97] Read *et al.* (1999) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
 [98] Shirai *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181 (Supl 3):S524-S527.
 5 [99] Solicitud de patente internacional WO99/27105.
 [100] Solicitud de patente internacional WO00/27994.
 [101] Solicitud de patente internacional WO00/37494.
 [102] Solicitud de patente internacional WO99/28475.
 [103] Ross *et al.* (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
 10 [104] Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
 [105] Zimmerman y Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
 [106] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Supl:S2-6.
 [107] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Enero 16;47(1):12,19.
 [108] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
 15 [109] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl 1:S101-107.
 [110] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
 [111] Solicitud de patente internacional WO02/34771.
 [112] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
 [113] Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
 20 [114] Kuroda *et al.* (2000) *Lancet* 357(9264):1225-1240; véase también páginas 1218-1219.
 [115] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85-100.
 [116] Demicheli *et al.* (1998) *Vaccine* 16:880-884.
 [117] Stepanov *et al.* (1996) *J Biotechnol* 44:155-160.
 [118] Ingram (2001) *Trends Neurosci* 24:305-307.
 25 [119] Rosenberg (2001) *Nature* 411:380-384.
 [120] Moingeon (2001) *Vaccine* 19:1305-1326.
 [121] EP-A-0372501
 [122] EP-A-0378881
 [123] EP-A-0427347
 30 [124] WO93/17712
 [125] WO94/03208
 [126] WO98/58668
 [127] EP-A-0471177
 [128] WO00/56360
 35 [129] WO91/01146
 [130] WO00/61761
 [131] WO01/72337
 [132] *Research Disclosure*, 453077(Enero 2002)
 [133] WO99/24578.
 40 [134] WO99/36544.
 [135] WO99/57280.
 [136] WO00/22430.
 [137] Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.
 [138] WO96/29412.
 45 [139] Pizza *et al.* (2000) *Science* 287:1816-1820.
 [140] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M Ausubel *et al.*, eds. 1987) Suplemento 30.
 [141] Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* (1981) 2:482-489.
 [142] WO03/009869.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición que comprende vesículas de membrana externa meningocócica, un adyuvante de hidróxido de aluminio, un tampón de histidina y cloruro sódico, donde: (a) la concentración de VMEs es inferior a 100 µg/ml; y/o (b) la concentración de cloruro sódico es superior a 7,5 mg/ml.
- 10 **2.** La composición de la reivindicación 1 donde la concentración de cloruro sódico es superior a 8 mg/ml.
- 10 **3.** La composición de la reivindicación 2 donde la concentración de cloruro sódico es 9 mg/ml.
- 15 **4.** La composición de cualquier reivindicación precedente donde la concentración de VMEs es inferior a 75 µg/ml.
- 15 **5.** La composición de la reivindicación 4 donde la concentración de VMEs es 50 µg/ml.
- 15 **6.** La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el tampón de histidina tiene entre pH 6,3 y pH 6,7.
- 20 **7.** La composición de la reivindicación 6 donde el tampón de histidina tiene pH 6,5.
- 20 **8.** La composición de cualquier reivindicación precedente donde el adyuvante está presente en 3,3 mg/ml (expresado como concentración Al^{3+})
- 25 **9.** La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso como un medicamento.
- 25 **10.** El uso de una vesícula de membrana externa meningocócica en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un paciente, donde el medicamento también comprende un adyuvante de hidróxido de aluminio, un tampón de histidina y cloruro sódico, y donde: (a) la concentración de VMEs es inferior a 100 µg/ml; y/o (b) la concentración de cloruro sódico es superior a 7,5 mg/ml.

FIGURA 1

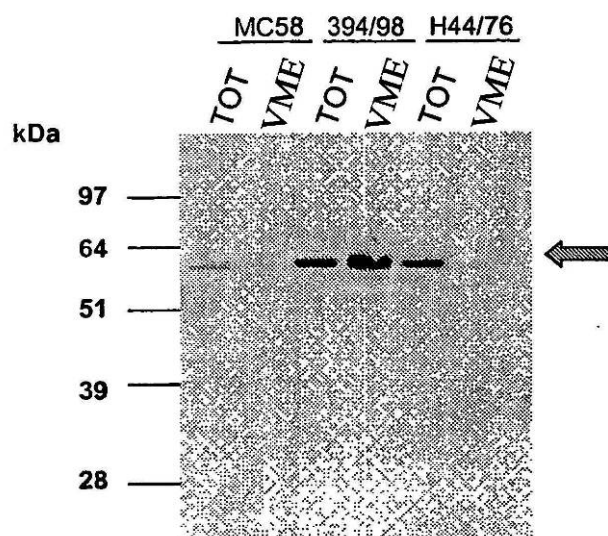


FIGURA 2

